



**ANÁLISIS DEL IMPACTO DE GLIFOSATO SOBRE
COMUNIDADES MICROBIANAS DE SUELOS DE LA
REGIÓN PAMPEANA MEDIANTE UN ENFOQUE
FISIOLÓGICO Y MOLECULAR**

Lic. Marco Allegrini

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN
CIENCIAS AGRARIAS**

Directora: Dra. Elena del Valle Gómez

Co-directora: Dra. María Celina Zabaloy

Año 2017

DECLARACIÓN JURADA

ANÁLISIS DEL IMPACTO DE GLIFOSATO SOBRE COMUNIDADES MICROBIANAS DE SUELOS DE LA REGIÓN PAMPEANA MEDIANTE UN ENFOQUE FISIOLÓGICO Y MOLECULAR

Marco Allegrini

Licenciado en Biotecnología

Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Agrarias, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en ésta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Biodiversidad Vegetal y Microbiana (IICAR-Facultad de Ciencias Agrarias-Universidad Nacional de Rosario) y en el Laboratorio de Ecología Microbiana de la Universidad Nacional del Sur (CERZOS-CONICET), durante el período comprendido entre el 1 de Marzo de 2013 (Aceptación: 27 de Agosto de 2013) y el 19 de Septiembre de 2017, bajo la dirección de la Dra. Elena del Valle Gómez y la co-dirección de la Dra. María Celina Zabaloy. Asimismo, la Tesis contiene resultados obtenidos durante una estadía de investigación doctoral en Julius-Kühn Institut (*Institute for Epidemiology and Pathogen Diagnostics*, Julius-Kühn Institut, Braunschweig, Alemania) durante el período 7 Abril-16 Septiembre del año 2016.

Marco Allegrini

Elena del Valle Gómez

María Celina Zabaloy

Defendida: 20 de Febrero de 2018.

AGRADECIMIENTOS

Llegando al final de esta etapa de mi vida quisiera agradecer a aquellas personas que me han acompañado durante todos estos años ayudándome a alcanzar las metas propuestas.

Quiero agradecer muy especialmente a la Dra. Elena Gómez y a la Dra. María Celina Zabaloy por haber confiado en mí desde un principio y haberme dirigido en este largo camino recorrido, por haber contribuido en gran medida a mi formación profesional y humana, por el apoyo y el excelente trato recibido en todo momento.

A la Dra. Kornelia Smalla por haber confiado en mí y por haberme recibido en Julius-Kühn Institut (Alemania) permitiéndome vivir una experiencia infinitamente enriquecedora en lo personal y en lo académico. A todo su excelente grupo de trabajo por haberme ayudado siempre y por compartir conmigo lindos momentos.

Al Ministerio de Educación de la Nación y al Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD) por haberme otorgado una beca de investigación doctoral en Alemania durante el año 2016 que ha contribuido inmensamente a mi formación.

A CONICET y AGENCIA por haber financiado el doctorado y contribuir a mi formación científica.

A mis compañeros y compañeras del laboratorio por ser excelentes personas y formar un lindo grupo de trabajo, y a los demás integrantes del IICAR por haberme dado una mano cuando fuese necesario.

A mi hermosa familia: a mi papá y a mi mamá, mi inmenso agradecimiento por el sacrificio realizado durante todos estos años para permitirme continuar con mis estudios y llegar hasta el final, por los valores inculcados, por acompañarme y contenerme en todo momento, por ser un ejemplo constante en mi vida. A mis hermanos por haber compartido tantos buenos momentos conmigo y apoyarme siempre en este largo camino. A mi abuela, abuelo, primos, tíos y tías por conformar una excelente familia en la cual me apoyé durante todos estos años y seguramente lo seguiré haciendo por el resto de mi vida.

A aquellas personas que hoy no me acompañan pero que han sido un pilar importante en este largo camino compartiendo lindos momentos y a mis grandes amigos de la vida que me acompañaron incondicionalmente durante todos estos años en Rosario.

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

PUBLICACIONES REALIZADAS EN EL MARCO DE LA TESIS

- **Publicaciones correspondientes a capítulos de la Tesis:**

CAPÍTULO 1:

Allegrini, M., Zabaloy, M.C., Gómez, E. (2015). Ecotoxicological assessment of soil microbial community tolerance to glyphosate. *Science of the Total Environment* **533**, 60-68.

CAPÍTULO 2:

Allegrini, M., Gómez, E., Zabaloy, M.C. (2017). Repeated glyphosate exposure induces shifts in nitrifying communities and metabolism of phenylpropanoids. *Soil Biology and Biochemistry* **105**, 206-215.

- **Publicaciones de temas relacionados con la Tesis:**

Zabaloy, M.C., Garland, J.L., Allegrini, M., Gómez, E. (2016). Soil microbial community-level physiological profiling as related to carbon and nitrogen availability under different land uses. *Pedosphere* **26(2)**, 216-225.

Zabaloy, M.C., Allegrini, M., Tebbe, D.A, Schuster, K., Gómez, E. (2017). Nitrifying bacteria and archaea withstanding glyphosate in fertilized soil microcosms. *Applied Soil Ecology* **(117-118)**, 88-95.

PRESENTACIONES A CONGRESOS

- XXIV Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. Bahía Blanca, 5 al 9 de Mayo de 2014. Organizado por la Asociación Argentina de la Ciencia del Suelo (AASC). Modalidad: póster.

Allegrini, M., Zabaloy, M.C., Ausilio, A., Gómez, E.V. (2014). Tolerancia de la comunidad microbiana de suelos de la región pampeana inducida por glifosato. XXIV Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo y II Reunión Nacional de Materia orgánica y Sustancias Húmicas: trabajos, comunicaciones, conferencias y cursos. Bahía Blanca (Argentina). ISBN: 978-987-24771-6-5.

- VIII Jornada de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Rosario. Rosario, Octubre de 2014. Organizado por la Universidad Nacional de Rosario. Modalidad: póster.

Allegrini, M., Zabaloy, M.C., Ausilio, A., Gómez, E.V. (2014). *Estudio de tolerancia de comunidades microbianas de suelos de la región pampeana inducida por glifosato. Libro de resúmenes de la VIII Jornada de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Rosario. ISBN: 978-987-702-123-3.*

- IV Congreso Nacional de Ecología y Biología de Suelos. Esquel, 28 al 30 de Abril de 2015. Organizado por la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco y la Sociedad Argentina de Ecología y Biología de Suelos. Modalidad: exposición oral.

Allegrini, M., Zabaloy, M.C., Schuster, K., Gómez, E.V. (2015). *Respuesta de la comunidad microbiana de suelos con y sin historia de glifosato a aplicaciones repetidas del herbicida. Libro de resúmenes del IV Congreso Nacional de Ecología y Biología de Suelos. Página 20.*

- XVII Congreso y XXXV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, Noviembre de 2015. Organizado por la Sociedad de Biología de Rosario (SBR). Modalidad: mesa redonda.

Allegrini, M. *Impacto de pesticidas en la microbiota del suelo: análisis molecular de comunidades microbianas. Publicación Periódica Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Resúmenes del XVII Congreso y XXXV Reunión Anual 2015. ISSN: 2314-1484.*

- III Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental. Buenos Aires, Noviembre de 2015. Organizado por la Asociación Argentina de Microbiología (AAM).

Allegrini, M., Zabaloy, M.C., Gómez, E.V. (2015). *El estrés por desecación no condiciona la tolerancia de las comunidades microbianas a glifosato. Libro de resúmenes del III Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental. Buenos Aires (Argentina). Sección Poster A-32.*

- XVII Jornadas Argentinas de Microbiología. Bahía Blanca, 6 al 9 de Junio de 2017. Organizado por la Asociación Argentina de Microbiología (AAM). Modalidad: póster.

Allegrini, M., Zabaloy, M.C., Gómez, E.V. (2017). *Efectos diferenciales de la desecación química de Avena sativa L. con glifosato en comunidades microbianas rizosféricas.*

ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	1
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	5
RESUMEN	7
ABSTRACT	10
INTRODUCCIÓN GENERAL	11
1. El herbicida glifosato	11
1.1 Cultivos resistentes (GR) y utilización de glifosato a nivel mundial y local	11
1.2 Descripción y modo de acción	13
1.3 Comportamiento en el suelo	14
1.3.1 Adsorción	15
1.3.2 Vías metabólicas de degradación	16
1.3.3 Movilidad en el suelo	17
2. El suelo como sistema biológico	18
2.1 Diversidad microbiana en el suelo	21
2.2 La rizosfera y su microbioma	21
2.3 Importancia del suelo en los ecosistemas. El rol de la microbiota	23
3. Respuestas de las comunidades microbianas del suelo a perturbaciones	24
3.1 Definición ecológica de disturbio y estrés	25
3.2 Estabilidad de las comunidades microbianas: resistencia y resiliencia	26
3.3 Redundancia funcional	26
3.4 Propiedades biológicas que contribuyen a la resistencia y resiliencia	27
3.4.1 Propiedades a nivel de población	28
3.4.2 Propiedades a nivel de comunidad	29
3.5 Tolerancia de la comunidad inducida por el contaminante	30
3.5 Costo de tolerancia: susceptibilidad a nuevas perturbaciones	30
4. Indicadores del estatus biológico de comunidades microbianas del suelo	31
4.1 Propiedades de los indicadores microbiológicos y métodos utilizados	32
4.2 Respiración basal (RB), respiración inducida por el sustrato (SIR) y cociente respiratorio (RQ)	35
4.3 Diversidad catabólica: perfiles fisiológicos	37
4.4 Perfiles basados en ADN	39
4.5 Cuantificación de genes específicos para distintos grupos microbianos	40
4.6 Grupos microbianos de relevancia ecológica	40
4.6.1 Microorganismos oxidantes del amoníaco (MOA)	41
4.6.2 <i>Actinobacteria</i>	42
4.7 Elementos genéticos móviles (EGMs)	43
4.7.1 Plásmidos IncP-1	44
4.7.2 Integrines de clase I	46
5. Estado del arte sobre el impacto de glifosato en comunidades microbianas del suelo	46
5.1 Estudios en suelo no rizosférico	47
5.2 Estudios en suelo rizosférico	50
5.3 Perspectivas futuras sobre estudios de impacto de glifosato en comunidades microbianas del suelo	51
OBJETIVOS	53

ÍNDICE

CAPÍTULO 1: EVALUACIÓN ECOTOXICOLÓGICA DE LA TOLERANCIA DE COMUNIDADES MICROBIANAS A GLIFOSATO	54
1. Introducción	54
2. Objetivo específico	57
3. Hipótesis	57
4. Materiales y métodos	57
4.1 Sitios de estudio y muestreo de suelos	57
4.2 Caracterización fisiológica y molecular de sitios con y sin historia de glifosato	59
4.2.1 Perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas (CLPP)	59
4.2.2 Análisis molecular de comunidades microbianas	60
4.2.2.1 Extracción de ADN de la comunidad	60
4.2.2.2 PCR cuantitativa (qPCR) de bacterias totales	60
4.2.2.3 PCR-DGGE de bacterias totales	61
4.3 Ensayo de tolerancia de la comunidad inducida por el contaminante (PICT): fase de detección	62
4.4 Análisis de datos	63
4.4.1 Perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas (CLPP)	63
4.4.2 Ensayo PICT: estimaciones de tolerancia	64
4.4.2 Análisis estadístico	64
5. Resultados	67
5.1 Perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas	67
5.2 PCR cuantitativa (qPCR) de bacterias totales y perfiles de DGGE de la comunidad bacteriana	69
5.3 Ensayo PICT (ingrediente activo)	70
5.4 Ensayo PICT (formulado comercial)	73
6. Discusión	75
7. Conclusiones	79
CAPÍTULO 2: ANÁLISIS DEL IMPACTO DE APLICACIONES REPETIDAS DE GLIFOSATO EN COMUNIDADES MICROBIANAS DE SUELOS CON Y SIN HISTORIA DEL HERBICIDA	80
1. Introducción	80
2. Objetivo específico	82
3. Hipótesis	82
4. Materiales y métodos	82
4.1 Sitios de estudio y muestreo de suelos	82
4.2 Diseño experimental y preparación de microcosmos	83
4.3 Análisis de respiración de las comunidades microbianas	84
4.4 Análisis molecular de comunidades microbianas	84
4.4.1 PCR cuantitativa (qPCR) de BOA y de bacterias totales	85
4.4.2 PCR-DGGE de BOA	86
4.5 Análisis estadístico	87
5. Resultados	89
5.1 Respiración de la comunidad microbiana	89
5.2 Análisis molecular de comunidades microbianas	91
5.2.1 Abundancia de bacterias totales y BOA	91
5.2.2 Estructura de la comunidad de BOA	93
6. Discusión	95
6.1 Efecto de aplicaciones repetidas en la fisiología de las comunidades	95
6.2 Efecto de aplicaciones repetidas en la abundancia de bacterias totales y BOA	98
6.3 Efecto de aplicaciones repetidas en la estructura de la comunidad de BOA	100
6.4 Consideraciones sobre la dosis de glifosato	102

ÍNDICE

6.5 Consideraciones finales	102
7. Conclusiones	103
CAPÍTULO 3: INTERACCIÓN ENTRE EXPOSICIÓN A GLIFOSATO Y DESECACIÓN-HUMEDECIMIENTO COMO FACTORES DE PERTURBACIÓN DE COMUNIDADES MICROBIANAS DEL SUELO	104
1. Introducción	104
2. Objetivos específicos	106
3. Hipótesis.....	106
4. Materiales y métodos.....	107
4.1 Sitios de estudio y muestreo	107
4.2 Diseño del experimento y preparación de microcosmos.....	107
4.3 Análisis de respiración de la comunidad microbiana	108
4.4 Análisis molecular de comunidades microbianas	109
4.4.1 PCR cuantitativa de bacterias totales, <i>Actinobacteria</i> , BOA y AOA	109
4.4.2 PCR-DGGE de BOA	111
4.5 Análisis estadístico.....	111
5. Resultados	112
5.1 Análisis fisiológico de comunidades microbianas	112
5.2 Análisis molecular de comunidades microbianas	113
5.2.1 Abundancia de bacterias totales, <i>Actinobacteria</i> , BOA y AOA.....	113
5.2.2 Estructura de la comunidad de BOA	115
5.2 Análisis integrado de datos fisiológicos y moleculares	116
6. Discusión.....	118
7. Conclusiones	124
CAPÍTULO 4: DESECACIÓN DE CULTIVOS DE COBERTURA CON GLIFOSATO: ANÁLISIS DE IMPACTO EN COMUNIDADES MICROBIANAS RIZOSFÉRICAS EN RELACIÓN A UN MÉTODO DE FINALIZACIÓN SIN HERBICIDA	126
1. Introducción	126
2. Objetivo específico	128
3. Hipótesis.....	128
4. Materiales y métodos.....	129
4.1 Diseño del ensayo.....	129
4.2 Obtención de exudados radicales	132
4.3 Análisis fisiológico de comunidades microbianas	132
4.3.1 Perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas	132
4.3.2 Índices de diversidad funcional	133
4.3.2 Análisis estadístico.....	134
4.4 Análisis molecular de comunidades microbianas	135
4.4.1 Extracción de ADN de la comunidad y cuantificación	135
4.4.2 Análisis del metagenoma	135
4.4.2.1 <i>Barcoded amplicon-sequencing</i>	136
4.4.2.2 Procesamiento de secuencias	137
4.4.2.3 Índices de diversidad α	137
4.4.2.4 Análisis estadístico	139
4.4.2.4.1 Diversidad α	139
4.4.2.4.2 Diversidad β	139
4.4.2.4.3 Composición de la comunidad bacteriana.....	140
4.4.3 PCR cuantitativa (qPCR) de bacterias totales, <i>Actinobacteria</i> , AOA y BOA ...	141
4.4.4 PCR-DGGE de <i>Betaproteobacteria</i>	142
4.4.5 Análisis molecular de elementos genéticos móviles	144

ÍNDICE

4.4.5.1 Cuantificación de plásmidos IncP-1	144
4.4.5.2 Cuantificación de integrones de clase I.....	146
4.4.5.2 Detección de plásmidos IncP-1 mediante PCR-Southern blot.....	146
5. Resultados	149
5.1 Análisis fisiológico de comunidades microbianas	149
5.1.1 Utilización de sustratos carbonados	149
5.1.2 Diversidad funcional y análisis de cocientes respiratorios	153
5.2 Análisis molecular de comunidades microbianas	156
5.2.1 <i>Barcoded amplicon sequencing</i>	156
5.2.1.1 Análisis de diversidad α	158
5.2.1.2 Análisis de diversidad β	159
5.2.1.3 Composición de la comunidad bacteriana de la rizosfera	162
5.2.2. Abundancia de BOA, AOA, <i>Actinobacteria</i> y bacterias totales.....	172
5.2.3. Estructura de la comunidad (<i>Betaproteobacteria</i>) mediante PCR-DGGE	177
5.2.4. Análisis molecular de elementos genéticos móviles	180
5.2.4.1 Cuantificación de plásmidos IncP-1	180
5.2.4.2 Detección de plásmidos IncP-1 mediante PCR-Southern blot.....	180
5.2.4.3 Cuantificación de integrones de clase I.....	184
6. Discusión.....	185
6.1 Análisis de perfiles fisiológicos de las comunidades.....	185
6.2 Consideraciones adicionales sobre el análisis fisiológico.....	190
6.3 Análisis de betaproteobacterias mediante PCR-DGGE.....	191
6.4 Abundancia de grupos microbianos mediante qPCR	193
6.5 Secuenciación de amplicones del gen del ARNr 16S.....	195
6.6 Análisis molecular de elementos genéticos móviles	204
6.7 Comparación de resultados obtenidos en diferentes fechas de muestreo mediante múltiples métodos de estudio	207
6.8 Aspectos pendientes de estudio y consideraciones finales	210
7. Conclusiones	212
DISCUSIÓN FINAL	215
1. Discusión general de los diferentes capítulos	215
2. Modelo integrador del impacto de glifosato en la rizosfera.....	223
3. Consideraciones finales	226
CONCLUSIÓN FINAL	228
ANEXO	230
BIBLIOGRAFÍA.....	251

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ACP: análisis de componentes principales
AMPA: ácido aminometilfosfónico
ANOVA: análisis de la variancia
 $amoA_{AOA}$: gen codificante para la subunidad α de arqueas oxidantes del amoníaco
 $amoA_{BOA}$: gen codificante para la subunidad α de bacterias oxidantes del amoníaco
ANOSIM: análisis de similitudes
AOA: arqueas oxidantes del amoníaco
AR: abundancia relativa
 $AR_{Actinobacteria}$: abundancia relativa de *Actinobacteria*
 AR_{AOA} : abundancia relativa de AOA
 AR_{BOA} : abundancia relativa de BOA
AUC: área integrada bajo la curva
BDOBS: BD Oxygen Biosensor System
BHR: amplio rango de hospedador
BM: biomasa microbiana
BOA: bacterias oxidantes del amoníaco
BUR: Mayor Buratovich
Cc: capacidad de campo
CC: cultivos de cobertura
CLPP: perfil fisiológico de la comunidad
CP: componente principal
Ct. threshold cycle (ciclo umbral) de las curvas de amplificación de PCR en tiempo real
DGGE: electroforesis en gel con gradiente de desnaturizante
DMSO: dimetilsulfóxido
dNTPs: deoxinucleótidos trifosfato
DOR: Coronel Dorrego
DP: diferencia de proporciones
EGMs: elementos genéticos móviles
E: equitatividad catabólica o de uso de sustratos carbonados
 E_H : índice de equitatividad de Shannon
Ex_C: exudado radical de plantas cortadas
Ex_G: exudado radical de plantas tratadas con glifosato
FC: formulado comercial
GR: resistente a glifosato
H: con historia de glifosato
H': índice de heterogeneidad de Shannon-Weaver

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

HAPs: hidrocarburos aromáticos policíclicos
IA: ingrediente activo
IBNs: inhibidores biológicos de la nitrificación
IC50: dosis inhibitoria máxima media
IncP-1: plásmidos del grupo de incompatibilidad 1
IR: índice respiratorio
IS: índice de selectividad
K_a: constante de adsorción
MOA: microorganismos oxidantes del amoníaco
NMDS: escalamiento no métrico multidimensional
NGS: *Next Generation Sequencing* o secuenciación de última generación
NH: sin historia de glifosato
NPMANOVA: análisis multivariado de la variancia no paramétrico
NRFU: unidades de fluorescencia relativa normalizadas
OTU: unidad operativa taxonómica
PAL: fenilalanina amonio liasa
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PCR-DGGE: PCR seguido de separación de los productos mediante DGGE
PFLA: ácidos grasos fosfolipídicos
P_i: fosfato inorgánico
PICT: tolerancia de la comunidad inducida por el contaminante
qCO₂: cociente metabólico
qPCR: PCR cuantitativa o PCR en tiempo real
R_{1/2}: relación de números de Hill (*Hill-ratio*)
RB: respiración basal
RFU: unidades de fluorescencia relativa
RQ: cociente respiratorio
RP: relación de proporciones
S': riqueza
SI: secuencia de inserción
SIR: respiración inducida por el sustrato
TAE: Tris-Acetato-EDTA
T-RFLP: polimorfismo de los fragmentos de restricción terminales
T-RFs: fragmentos de restricción terminales
UPGMA: agrupamiento pareado no ponderado utilizando media aritmética
ZAV: Zavalla
λ: índice de heterogeneidad de Simpson
Ø: diámetro

RESUMEN

La intensificación agrícola característica de los últimos tiempos, tanto en Argentina como a nivel mundial, depende en gran medida de la utilización de herbicidas para el control de malezas en cultivos y pasturas. El glifosato [N-(fosfonometil)glicina] es el herbicida más utilizado en el mundo en la actualidad. Es un herbicida de amplio espectro, no selectivo, usado en pre-siembra o post-emergencia, cuyo consumo se incrementó impulsado por la difusión de los cultivos genéticamente modificados resistentes al principio activo (GR) y la expansión de la agricultura en siembra directa. Asimismo, es utilizado también como agente de desecación química en cultivos sensibles, por ejemplo, para la supresión de cultivos de cobertura. La potencial alteración de las comunidades microbianas y los procesos biológicos del suelo por el glifosato ha despertado un particular interés ya que las comunidades microbianas edáficas llevan a cabo importantes funciones en el ecosistema.

El objetivo de esta Tesis Doctoral fue evaluar el impacto de glifosato en comunidades microbianas del suelo. Para ello, se llevaron a cabo diferentes experimentos desde un enfoque tanto fisiológico como molecular. En primera instancia, en un estudio de carácter observacional, se determinó si la exposición crónica al herbicida puede conducir a un incremento en la tolerancia de la comunidad. Los resultados de la estrategia ecotoxicológica PICT (*Pollution Induced Community Tolerance*), con el ingrediente activo (IA) y con un formulado comercial (FC), indicaron que las comunidades microbianas de suelos con larga historia de exposición a campo (H) no presentan una mayor tolerancia respecto de aquellas presentes en suelos sin historia (NH). La tolerancia no incrementada fue consistente con un estudio posterior en microcosmos en el cual no se observó un fenómeno de “costo de tolerancia” frente a un disturbio secundario (dsecación-humedecimiento). El efecto de un ciclo de desecación-humedecimiento sobre un indicador de estrés metabólico (cociente respiratorio, RQ), no fue significativo en el sitio H ni en el sitio NH. Asimismo, se demostró que en el sitio H la abundancia de genes indicadores de diferentes grupos microbianos, entre ellos bacterias totales, *Actinobacteria*, bacterias y arqueas oxidantes del amoníaco (BOA y AOA, respectivamente), en respuesta al disturbio mencionado, no se encuentra condicionada por la presencia/ausencia de una aplicación previa de glifosato.

Sin embargo, en un experimento en microcosmos se observó que aplicaciones repetidas de glifosato conducen a modificaciones fisiológicas y a nivel de estructura de la comunidad. El RQ, con ácido *p*-cumárico como sustrato, se incrementó luego de tres aplicaciones del ingrediente activo (IA) respecto del control, tanto en sitios H como NH, indicando una condición de estrés metabólico y un posible impacto sobre microorganismos capaces de catabolizar fenilpropanoides. El FC, a diferencia del IA, mostró mayores efectos a nivel de

RESUMEN

estructura de la comunidad de BOA. En una de las dos localidades estudiadas, los perfiles basados en ADN de este grupo específico de microorganismos, indicaron una menor similitud de microcosmos con tres aplicaciones del FC respecto de microcosmos control, tanto para el sitio H como el NH, no observada con el IA. De la misma manera, en ambos sitios se observaron modificaciones en la abundancia relativa de BOA.

Finalmente, se estudiaron las comunidades microbianas rizosféricas de *Avena sativa* L., especie utilizada frecuentemente como cultivo de cobertura (CC) y tratada con glifosato durante la etapa de finalización del cultivo. Se observaron efectos diferenciales de la desecación con un FC de glifosato, respecto de un método sin herbicida (corte). Si bien la estructura de la comunidad bacteriana (diversidad α y β) no mostró un efecto significativo del método de finalización, se detectaron diferencias en los perfiles catabólicos de las comunidades (CLPP) como así también en la diversidad catabólica y en la abundancia relativa de ciertos grupos bacterianos, entre ellos, las BOA. A los 26 días post-tratamiento, la diversidad catabólica observada fue mayor en el método con glifosato y los perfiles fisiológicos se diferenciaron significativamente, con una utilización mayor de todos los sustratos carbonados evaluados. Además, la rizosfera de plantas secadas con glifosato presentó una menor abundancia de AOA, una mayor abundancia relativa del OTU 35 (*Mesorhizobium* sp., posiblemente involucrada en la degradación de fosfonatos), y se detectaron plásmidos promiscuos IncP-1 ϵ , no observados en ausencia de glifosato. Un mecanismo putativo de impacto de glifosato basado en la exudación incrementada de compuestos fenólicos inhibitorios explicaría la menor abundancia de AOA y de BOA, mientras que la exudación directa de glifosato, reportada en diversos estudios, sería la causa del incremento de bacterias degradadoras de fosfonatos.

Los resultados obtenidos mediante la estrategia PICT, apoyados por la ausencia de un fenómeno de “costo de tolerancia” frente a un disturbio secundario (desección-humedecimiento), permiten concluir que la exposición crónica de las comunidades microbianas a glifosato no conduce a un incremento en la tolerancia. Sin embargo, la ausencia de una respuesta PICT es insuficiente para concluir que no han ocurrido modificaciones en la comunidad. Las evidencias obtenidas a partir del estudio de impacto de aplicaciones repetidas en microcosmos sugieren que podrían existir modificaciones en grupos específicos de microorganismos, entre ellos, las BOA, un grupo clave en el ciclo del N. La estrategia PICT podría ser sensible a grandes cambios en la comunidad pero insensible a poblaciones especializadas dentro de la misma. Por tal motivo es necesario considerar también indicadores relacionados con grupos específicos y ecológicamente relevantes para una evaluación precisa y abarcativa de los efectos del herbicida. Asimismo,

RESUMEN

es necesario incluir a la microbiota rizosférica en las evaluaciones de impacto. Las diferencias observadas entre comunidades microbianas rizosféricas de plantas de *A. sativa* finalizadas por desecación o corte, a los 26 días post-tratamiento, podrían derivar en efectos diferenciales sobre el ensamble de comunidades microbianas rizosféricas del cultivo sucesor, aspecto que deberá evaluarse en futuras investigaciones. De la misma manera, el enriquecimiento en bacterias degradadoras de fosfonatos a los 26 días podría estar asociado a una mayor potencial de degradación de glifosato en la rizosfera de plantas tratadas con el herbicida, aspecto que también deberá abordarse en próximos estudios. Finalmente, esta Tesis demuestra, por primera vez, que la abundancia de microorganismos oxidantes del amoníaco (MOA) constituye un indicador sensible frente a un FC de glifosato, tanto en suelo rizosférico como no rizosférico, con el potencial de ser utilizado en programas de monitoreo en el largo plazo. Asimismo, se propone un mecanismo putativo de impacto de glifosato en la rizosfera relacionado con la exudación incrementada de compuestos fenólicos que podría explicar la reducción observada en la abundancia de MOA.

ABSTRACT

ASSESSMENT STUDY OF GLYPHOSATE IMPACT ON SOIL MICROBIAL COMMUNITIES FROM ARGENTINIAN PAMPAS

Glyphosate is the most used herbicide worldwide. While contrasting results have been observed related with its impact on soil microbial communities, more studies are necessary to elucidate the potential effects of the herbicide. The objective of this research was to assess the impact of glyphosate on soil microbial communities from Argentinian Pampas soils. An initial observational study was conducted to assess the tolerance to glyphosate of contrasting soils with (H) and without (NH) history of exposure to the herbicide using the ecotoxicological approach *Pollution Induced Community Tolerance* (PICT). Results from three different locations indicated that tolerance to glyphosate was not higher in H soils than in NH soils either for the active ingredient (AI) or a commercial formulation (CF). The non-increased tolerance in H soils was consistent with a following research at microcosm level in which no “*cost of tolerance*” result was observed for the microbial community upon a secondary disturbance frequently detected in the soil environment (dry-rewetting). The effect of a dry-rewetting cycle on a metabolic stress indicator (respiratory quotient, RQ) was not significant in H or NH site. Similarly, when the agricultural H site was assessed by molecular methods, the response of different indicator genes to a dry-rewetting cycle was not conditioned by a previous application of a CF. However, these results should not be considered a strong evidence of no changes in soil microbial communities induced by the herbicide. Further research in soil microcosms revealed changes in the physiology and structure of microbial communities after repeated applications. The RQ with *p*-coumaric acid was increased after three applications of the AI relative to control microcosms, in H and NH sites, while the relative abundance and structure of AOB was also modified in both sites in one of the two locations assessed, but only under CF exposure. Finally, soil microbial communities from the rhizosphere were included in the study in order to get a more accurate and comprehensive assessment of glyphosate impact. In a greenhouse assay, soil microbial communities from the rhizosphere of a cover crop (*Avena sativa* L.) suppressed by a non-chemical method (mowing) were compared with communities from glyphosate desiccated plants. Differential effects were observed in catabolic diversity, in the abundance of specific bacterial groups (namely BOA, AOA and *Bacilli*) or species (*Mesorhizobium* sp.) as well as in the occurrence of broad host range IncP-1 plasmids. This research demonstrates the applicability of BOA and AOA as indicators of glyphosate impact in different soil environments and proposes a putative model to explain the differential effects of glyphosate and mowing methods on rhizospheric microbial communities.

INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. El herbicida glifosato

1.1 Cultivos resistentes (GR) y utilización del herbicida a nivel mundial y local

Desde su comercialización por primera vez en 1974, el herbicida glifosato se ha convertido en el más utilizado en el mundo, principalmente a partir de 1996 debido a la amplia adopción de cultivos transgénicos resistentes a glifosato (GR o RR) incluyendo soja, maíz, canola, algodón y caña de azúcar (Duke y Powles, 2008). A nivel global, el uso de glifosato se ha incrementado más de 15 veces desde la introducción de los llamados cultivos GR (Benbrook, 2016), con una proyección estimada de 1,35 millones de toneladas en 2017 (Newman *et al.*, 2016a). En Estados Unidos, por ejemplo, se han aplicado 1,6 billones de kilogramos del ingrediente activo (IA) desde 1974 (Benbrook, 2016). En Argentina solamente, se aplican más de 160.000 toneladas anuales del IA para el control de malezas en cultivos resistentes de soja y maíz como así también en barbecho químico (CONICET, 2009). Los datos correspondientes a los primeros cinco años desde la introducción del primer cultivo GR en Argentina evidencian claramente la expansión del glifosato y de la soja GR en el mercado argentino y la tendencia creciente que experimentó el paquete tecnológico desarrollado por la compañía Monsanto (Tabla 1) (Qaim y Traxler, 2005).

Argentina es uno de los mayores productores mundiales de alimentos, con 33,2 millones de hectáreas destinadas a la agricultura. La producción de soja, en particular, ha experimentado un incremento sin precedentes en los últimos 20 años. En 2012, el área destinada a la producción de soja fue de 19 millones de hectáreas. Comparado con el año 1990, esto representa el cuádruple de superficie sembrada (Figura 1) (VIB, 2013).

Tabla 1. Expansión del herbicida glifosato y de soja resistente a glifosato (GR) en el mercado argentino. Se indican los valores anuales desde la introducción del primer genotipo de soja GR. Fuente: Qaim y Traxler (2005).

	95-96	96-97	97-98	98-99	99-2000	2000-01
Área total sembrada con soja (millones ha ⁻¹)	5,91	6,39	6,95	8,18	8,64	10,32
Área con soja GR (millones ha ⁻¹)	0	0,04	1,76	4,8	6,64	9,29
Número de compañías proveedoras de semillas GR	0	1	2	4	7	7
Venta de glifosato (millones de litros)	7,62	12,63	28,52	45,53	60,97	82,35
Número de compañías proveedoras de glifosato	14	17	18	21	19	22
Precio de comercialización del glifosato (\$ por litro)	5,63	5,11	4,05	3,22	2,81	2,67

INTRODUCCIÓN GENERAL

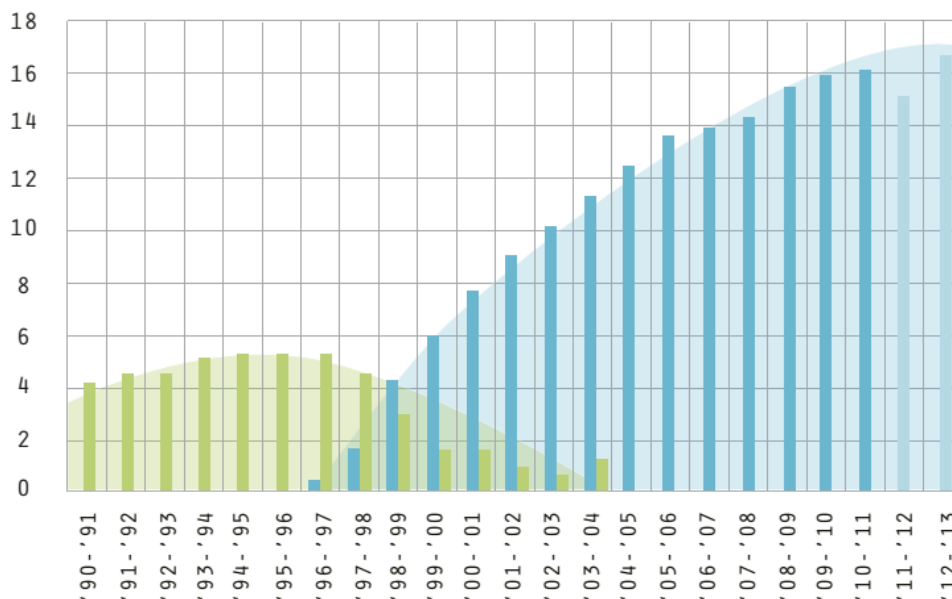


Figura 1. Expansión del área sembrada con soja resistente a glifosato (GR) en Argentina. Las barras azules corresponden al área sembrada con soja GR (millones de hectáreas), mientras que las verdes corresponden a soja no resistente. Se observa un incremento vertiginoso desde la introducción de la resistencia a glifosato (1996). Fuente: VIB (2013).

En el año 2001 la producción de soja Roundup Ready (RR) resistente a glifosato ocupaba un 90% del área dedicada a este cultivo en Argentina (Qaim y Traxler, 2005; Trigo, 2011); actualmente el 100% del área sembrada con soja corresponde al genotipo GR (Trigo, 2011). En la Pampa Húmeda se concentra principalmente en el Sur de Santa Fe, Centro-Norte de Buenos Aires y Este de Córdoba. En el sudoeste de la provincia de Buenos Aires, el trigo (*Triticum aestivum* L.) en siembra directa es el principal cultivo de invierno, donde el control químico de malezas con glifosato durante el barbecho y la implantación del cultivo es clave para lograr la mayor eficiencia de uso del agua y nutrientes (Vigna y López, 2002). La difusión masiva del herbicida en soja RR y en lotes de barbecho químico destinados a la siembra directa de varios cultivos, ha generado la propagación de malezas tolerantes o que han desarrollado estrategias de "escape", provocando dificultades para un control efectivo mediante las dosis comúnmente recomendadas (Rainero, 2008; Vigna *et al.*, 2008; Papa *et al.*, 2012). Esta situación hace necesario implementar cambios en los tratamientos tradicionales con la modificación de dosis, aplicaciones repetidas y/o la incorporación de nuevos principios activos en mezcla.

En un informe de evaluación de la información científica existente vinculada a la incidencia del glifosato sobre la salud humana y el ambiente (Comisión Nacional de Investigación sobre Agroquímicos, CONICET, 2009), se alertó sobre la necesidad de evaluar efectos a largo plazo y exposición a aplicaciones reiteradas de glifosato sobre organismos y

INTRODUCCIÓN GENERAL

sus interacciones, ya que la escasa información disponible impide una evaluación certera de riesgo para la biota, asociada al uso extensivo del glifosato. Asimismo, especialistas de áreas involucradas en el estudio de los aspectos ambientales del uso de glifosato, también destacaron la necesidad de estudios ecotoxicológicos locales que aborden los efectos de la aplicación de glifosato en el ambiente y según características particulares de cada zona. Además, remarcan la importancia de investigar el efecto de la molécula de glifosato en la diversidad de condiciones ambientales o ecosistemas locales y específicamente en organismos no blanco (INTA Balcarce, 2010).

1.2 Descripción y modo de acción

El glifosato es un herbicida sistémico, no selectivo, de amplio espectro y de post-emergencia que controla malezas anuales y perennes. Es el nombre alternativo o común del compuesto organofosforado N-(fosfonometil)glicina, de acuerdo a la nomenclatura de la IUPAC. Se comercializa usualmente como la sal del ácido desprotonado y un catión (ej.: potasio, isopropilamina, dimetilamonio), siendo los ingredientes básicos de los formulados comerciales la sal de glifosato más uno o varios surfactantes en solución acuosa. Una de las formulaciones más extendidas es la que contiene 480 g l⁻¹ de la sal de isopropilamina (equivalente a 360 g l⁻¹ del ácido libre) (CONICET, 2009) aunque los formulados que contienen la sal de potasio son también ampliamente utilizados.

Para ejercer su acción herbicida, el glifosato ingresa a la planta a través de los tejidos verdes para moverse en el apoplasto y en el simplasto rápidamente hacia los meristemas, donde detiene el crecimiento. Luego de una rápida penetración a través de la cutícula se produce el ingreso al simplasto, posiblemente mediante un mecanismo pasivo de difusión o bien mediante un transportador de fosfato en la membrana plasmática (Gomes *et al.*, 2014). Las propiedades fisicoquímicas le permiten ser translocado desde la hoja, por medio del floema, hacia los mismos tejidos que constituyen reservas en la planta. Esto significa que puede alcanzar meristemas, raíces y hojas jóvenes, órganos de almacenamiento y cualquier tejido en crecimiento activo (Duke y Powles, 2008). El ápice del tallo y los extremos de las raíces son un destino importante de glifosato debido a la alta tasa de crecimiento y de actividad metabólica (Gomes *et al.*, 2014).

El glifosato actúa inhibiendo la enzima 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato sintasa (EPSPS), que cataliza la transferencia del grupo enolpiruvil desde el fosfoenolpiruvato al shikimato-3-fosfato para producir 5-enolpiruvilshikimatato 3-fosfato y fosfato inorgánico (Pi). La reacción catalizada por la enzima EPSPS constituye el paso limitante de la vía del shikimato, una vía metabólica esencial para la síntesis de aminoácidos aromáticos y otros

INTRODUCCIÓN GENERAL

compuestos derivados como los fenilpropanoides con múltiples funciones, entre ellas, la defensa contra patógenos (Duke y Powles, 2008). La vía del shikimato se encuentra presente en algas, arqueas, bacterias y hongos como así también en parásitos apicomplejos pero no en animales (Roberts *et al.*, 2002; Richards *et al.*, 2006). El glifosato es un análogo del fosfoenolpiruvato en el estado de transición, uno de los sustratos utilizados por la EPSPS. La inhibición resultante conduce a la pérdida de regulación de la vía por retroalimentación negativa (*feedback inhibition*) y ello a su vez termina en un flujo masivo de carbono hacia la formación de shikimato-3-fosfato que es convertido y acumulado como shikimato. El modo en que la inhibición de la vía del shikimato inducida por glifosato desencadena la muerte de la planta no ha sido completamente dilucidado. Por un lado se asume que el principal efecto es la insuficiente producción de aminoácidos aromáticos para mantener la síntesis proteica. Por otro lado, se ha propuesto que el aumento del flujo de carbono a la vía del shikimato como consecuencia de la ausencia de inhibición por retroalimentación, resulta en la privación de carbono para otras vía esenciales (Duke y Powles, 2008).

Se ha determinado también que, además de los bajos niveles de triptófano, tirosina y fenilalanina, las células sensibles a glifosato poseen niveles hasta un 65% más bajos de otros aminoácidos importantes como glicina, serina y metionina. Asimismo, existen evidencias que demuestran un exceso de amonio en plantas tratadas con glifosato, posiblemente relacionado con la estimulación de la actividad fenilalanina amonio liasa (PAL) (Nafziger *et al.*, 1984). En plantas de tabaco transgénicas se determinó que la reducción en el *pool* de aminoácidos aromáticos como consecuencia del glifosato resulta en una estimulación del flujo metabólico a través de la vía del shikimato, conduciendo en última instancia a un incremento en la actividad PAL como así también a niveles incrementados de ácido clorogénico (compuesto polifenólico relacionado con el cinamato) (Guillet *et al.*, 2003). Parte (o posiblemente todos) de los efectos tóxicos del glifosato podrían estar relacionados entonces con la estimulación de la enzima PAL (Duke *et al.*, 1980). Los compuestos fenólicos producidos a partir de esta enzima y el amonio liberado en la reacción y acumulado explicarían la toxicidad (Duke *et al.*, 1978). La estimulación de la actividad PAL por el glifosato ha sido observada hasta el momento tanto en plántulas de soja (Duke *et al.*, 1980; Hoagland, 1980) como de maíz (Duke y Hoagland, 1978).

1.3 Comportamiento en el suelo

El destino final de los herbicidas en el ambiente es un tema de creciente preocupación dado que sólo una pequeña parte de los químicos aplicados llegan a los organismos blanco

(Pimentel, 1995), lo cual implica un potencial impacto del herbicida residual en el suelo y en el agua sobre la salud humana, animal y de los cultivos. El suelo es uno de los principales reguladores de la movilidad de los herbicidas en el ambiente. En él ocurren diversos procesos biológicos y químicos que determinan la retención o el transporte, entre ellos, los fenómenos de adsorción, lixiviación, degradación química y degradación biológica. Estos procesos ocurren en paralelo y están interrelacionados (Zabaloy *et al.*, 2011).

Una vez que el glifosato interactúa con el suelo, ya sea por aplicación directa a la superficie del suelo, por exudación desde las raíces de las plantas o al ser liberado de tejidos vegetales tras la descomposición de los mismos, se encuentra sujeto a diferentes procesos que controlan su comportamiento y destino en el suelo. Estos procesos incluyen la adsorción-desorción, transporte o movilidad (lixiviación) y degradación.

1.3.1 Adsorción

Entre los procesos que determinan el destino del glifosato en el suelo, la adsorción es el más importante ya que controla la disponibilidad para la degradación biológica, para la absorción por parte de la planta y para la movilidad a través del suelo desde el sitio donde se encuentra hacia otros sectores (Duke *et al.*, 2012). La adsorción del glifosato es un proceso que ha sido tratado extensamente en diferentes publicaciones por su importancia para la movilidad y destino en el suelo (Vereecken, 2005). El glifosato se adsorbe fuertemente en el suelo, con constantes de adsorción varias veces mayor que la de otros herbicidas (ej.: 100 veces mayor que para el herbicida 2,4-D). La adsorción de glifosato se produce preferencialmente en las superficies de carga variable como son los óxidos de Al y Fe, silicatos de Al (imogolita) y goethita (oxihidróxido de hierro III). En menor medida la adsorción tiene lugar en los óxidos de Fe de carga permanente de ciertos minerales (illita y vermiculita) y en la materia orgánica. Los mecanismos fisicoquímicos que conducen dicha adsorción son el intercambio de ligandos y la formación de complejos con la superficie de los óxidos minerales (Duke *et al.*, 2012). Sin embargo, todavía no existe un consenso sobre los principales factores que controlan la adsorción. Varios autores indican que la adsorción es más fuerte en suelos arcillosos (Sprankle *et al.*, 1975), relacionándose la adsorción con el contenido de arcillas y la capacidad de intercambio catiónico (Hiera da Cruz *et al.*, 2007; Glass, 1987).

Una vez adsorbido, el glifosato no se libera fácilmente. Esto se debe a los altos valores de las constantes de adsorción (K_a) para este herbicida comparado con otros como el 2,4-D (hasta 100 veces mayores) (Farenhorst *et al.*, 2008). Se estima que aproximadamente entre un 5-24% del glifosato inicialmente adsorbido es liberado, dependiendo del tipo de suelo (Al-

Rajab *et al.*, 2008). Sin embargo, ciertos factores pueden reducir su adsorción, entre ellos, los niveles de fosfatos presentes en el suelo. La adsorción de glifosato por medio del grupo fosfonato a través de un mecanismo de intercambio de ligando, es relativamente similar a la adsorción de fosfatos. Debido a esta similitud, es probable que ambos se adsorban a los mismos sitios en el suelo, compitiendo por los sitios disponibles. Por lo tanto, los fosfatos provenientes de la fertilización fosforada podrían tener influencia en la movilidad de glifosato. Se ha observado que la adsorción de glifosato añadido inicialmente al suelo disminuye al agregar fosfato (Gimsing *et al.*, 2004). De manera similar, al añadir glifosato a suspensiones de suelo conteniendo diferentes concentraciones de fosfato la adsorción disminuye a medida que aumentan los niveles de fosfato (Dion *et al.*, 2001).

1.3.2 Vías metabólicas de degradación

La degradación de glifosato ha sido extensamente investigada durante más de 30 años. Los primeros estudios al respecto se basaron en cepas aisladas de *Pseudomonas* (Kishore y Jacob, 1987) y *Arthrobacter* (Pipke *et al.*, 1987), las cuales eran capaces de crecer en un medio con glifosato como única fuente de P, y en las cuales se observó que el evento primario de la degradación consistía en la ruptura del enlace C-P. Posteriormente, mediante cultivos de enriquecimiento con glifosato, se obtuvieron varios aislamientos de *Pseudomonas* spp. de un suelo con exposición crónica a glifosato capaces de crecer en él como única fuente de P. En algunos de estos aislamientos de *Pseudomonas*, como así también en *Bacillus megaterium*, se observó la capacidad de degradar no sólo glifosato sino 14 de 15 fosfonatos diferentes (Quinn *et al.*, 1989). Liu *et al.* (1991) también demostraron que diferentes miembros de la familia *Rhizobiaceae*, incluyendo *Rhizobium* spp. y *Agrobacterium* spp., podían utilizar glifosato y su metabolito derivado, el ácido aminometilfosfónico (AMPA), como única fuente de P bajo condiciones limitantes de este elemento en medio líquido. Muchos aislamientos han demostrado tener la capacidad de degradar glifosato y utilizarlo como única fuente de P una vez que el fosfato inorgánico (Pi) se torna limitante en el ambiente (McGrath *et al.*, 1997).

La degradación de glifosato en el suelo es cometabólica dado que no es utilizado como una fuente de C y energía por la mayoría de los microorganismos (Zabaloy *et al.*, 2011). Existen dos vías de degradación enzimática de este fosfonato caracterizadas en bacterias y que permiten el aprovechamiento del fósforo. Una de ellas, comúnmente conocida como “vía de la sarcosina” consiste en la ruptura directa del enlace C-P liberando sarcosina y Pi, donde la sarcosina es posteriormente mineralizada a dióxido de carbono y amonio. El enlace químicamente inerte C-P es destruido por un intrincado complejo multienzimático conocido

como C-P liasa. La ruptura del enlace C-P en la vía de la sarcosina depende fuertemente de las concentraciones de Pi exógenas y endógenas, y por lo tanto, se induce sólo bajo condiciones de deficiencia de fósforo. En la otra vía de degradación ampliamente extendida en bacterias, la molécula de glifosato es atacada primero por una enzima denominada glifosato oxidoreductasa (GOR) capaz de romper el enlace C-N originando como producto ácido aminometilfosfónico (AMPA) y glioxilato. El glioxilato ingresa posteriormente en la vía del glioxilato para ser metabolizado, mientras que el AMPA es exportado al espacio extracelular. Sólo algunas cepas bacterianas son capaces de metabolizar este compuesto en una reacción catalizada por una C-P liasa del tipo de la presente en *E. coli*, y cuyo productos son metilamina y Pi (Sviridov *et al.*, 2012).

A pesar de que las bacterias son consideradas los principales degradadores biológicos de glifosato en el suelo, los hongos también son importantes en este proceso (Singh y Walker, 2006), entre ellas, especies de los géneros *Penicillium*, *Trichoderma* y *Aspergillus* (Krzysko-Lupicka *et al.*, 1997). De hecho, el primer reporte de un microorganismo capaz de utilizar glifosato como fuente de N fue en el hongo *Penicillium chrysogenum* (Klimek *et al.*, 2001).

1.3.3 Movilidad en el suelo

De acuerdo con estudios efectuados con lisímetros y columnas de suelo existen evidencias de que el glifosato podría interactuar con la materia orgánica del suelo soluble en agua como así también con partículas de arcilla y con óxidos de hierro que componen la fracción coloidal. Por lo tanto, esto podría conducir a un transporte de glifosato mediado por coloides. Sin embargo, no sería éste el principal mecanismo de transporte. La movilidad y la filtración de glifosato son dominadas por mecanismos de flujo preferencial. El glifosato sería transportado a las capas más profundas del suelo al combinarse una alta intensidad de precipitaciones luego de la aplicación junto con un suelo de tipo macroporoso húmedo, aun cuando el compuesto sea fuertemente adsorbido y de relativamente rápida degradación (Vereecken, 2005).

En general, la movilidad de los pesticidas, y por ende, el riesgo de filtrarse hacia capas más profundas, ha sido correlacionada con una adsorción débil a la matriz del suelo, es decir, de valores bajos de K_a . Sin embargo, un número creciente de estudios indican que pesticidas con valores de K_a normalizadas según el contenido de materia orgánica (K_{oc}) mayores a 1000, como el glifosato (Farenhorst *et al.*, 2008), han sido observados en aguas subterráneas y de drenado en varios lugares a nivel mundial (Vereecken, 2005). Esto

sugiere que aun cuando la adsorción sea alta, existe riesgo de movilidad y filtrado a través del suelo.

Un aspecto importante en relación a la movilidad de glifosato en el suelo es la posibilidad de re-movilización como consecuencia de la aplicación de fertilizantes. Esto se debe a que la adsorción por intercambio de ligando que tiene lugar a través del grupo fosfonato es similar a la adsorción del grupo fosfato. La aparente similitud en los mecanismos de adsorción implica que probablemente los mismos sitios sean utilizados por el glifosato y los fosfatos, que compiten por la adsorción (Gimsing y Borggaard, 2001, 2002). Se ha determinado que la adsorción de ambos es tanto competitiva como aditiva, lo cual podría influenciar la movilidad del glifosato en el suelo (Gimsing *et al.*, 2004).

2. El suelo como sistema biológico

Diferentes definiciones del suelo (SSSA, 2008; Soil Survey Staff, 2014) coinciden conceptualmente en que el suelo **es un sistema heterogéneo, dinámico y en constante evolución**, originado por distintos procesos físicos, químicos y biológicos que actúan sobre el material original o roca madre. Al mismo tiempo expresan claramente la presencia de una fase sólida, una líquida y una gaseosa en su constitución que puede observarse claramente al tomar una porción de suelo. La fase sólida está compuesta por materia orgánica e inorgánica (fracción mineral) que, a través de distintos arreglos, dan lugar a la estructura del suelo (Conti y Giuffré, 2011). La fracción mineral presenta partículas de diversos tamaños, que pueden ir desde macroscópicas a fragmentos no visibles aun con microscopios comunes. Estas partículas reciben el nombre de arenas (las de mayor tamaño, 2000-50 μm), limos (tamaño intermedio, 50-2 μm) y arcillas (menor tamaño, <2 μm). Aunque la cantidad de materia orgánica de los suelos es reducida (en promedio constituye alrededor de un 5% de su parte sólida) es responsable de diversas propiedades relacionadas con la formación, organización y funcionamiento específico de los mismos. La estructura incluye finalmente un sistema poroso que permite intercambiar gases (fase gaseosa), percolar y retener agua (fase líquida) (Conti *et al.*, 2000).

Las definiciones citadas previamente ponen de manifiesto también el concepto de suelo como un sistema natural **abierto**. La presencia de vida animal, vegetal y microbiana lo diferencia claramente de la roca inerte (material parental) que le dio origen, de la misma manera que lo hace su organización estructural, la cual es un reflejo de los diferentes procesos de formación del suelo (pedogénesis). La **capacidad de responder a cambios ambientales** también lo diferencia de la roca inerte de la cual se originó y contribuye a su continua variabilidad en el espacio y en el tiempo. La formación del suelo implica miles o

INTRODUCCIÓN GENERAL

millones de años. Esto lo convierte en un recurso natural limitado e implica que un mal manejo del mismo puede conducir a un deterioro difícil de revertir (Conti y Giuffré, 2011).

Existen cinco factores formadores que influyen en el desarrollo del suelo y que han sido descritos como esenciales en la formación: el material parental, el clima, la biota, la topografía y el tiempo (Schoonover y Crim, 2015). De todos ellos, esta Tesis se ocupará específicamente de la biota del suelo y dentro de ella, de las comunidades microbianas.

En el suelo existen numerosas formas de vida distribuidas en lo que puede denominarse una “pirámide poblacional”, es decir, los organismos de menor tamaño (microbiota) son los más abundantes y los que representan la mayor proporción con respecto a la masa viva total (exceptuando lombrices) (Conti y Giuffré, 2011). Un aspecto notable que caracteriza al suelo es la gran heterogeneidad en sus características estructurales y fisicoquímicas que dan lugar a un gran número de microhábitats diferentes para el desarrollo de comunidades microbianas. Estas comunidades serán, precisamente, el objeto de estudio de la Tesis y sobre las cuales se analizará el impacto del herbicida glifosato, como se comentará en las siguientes secciones. En relación a la microbiota del suelo es importante mencionar, desde un principio, que los análisis de comunidades microbianas mediante métodos basados en ADN, desarrollados a lo largo de los Capítulos 1 a 4, se centrarán exclusivamente en bacterias y arqueas del suelo, principalmente debido a la presencia en estos organismos de la vía metabólica afectada por el herbicida glifosato, ausente en el Reino Animal (y por lo tanto en la microfauna). La vía se encuentra presente también en los parásitos apicomplejos, tal como se mencionó anteriormente (Roberts *et al.*, 2002). Si bien esta vía también se presenta en el Reino Fungi, los hongos no fueron considerados en los análisis moleculares incluidos en esta Tesis.

El suelo como sistema biológico puede considerarse como un sistema complejo de microhábitats que posee las siguientes propiedades distintivas:

- Es un sistema estructurado, heterogéneo y discontinuo, generalmente pobre en nutrientes y fuentes de energía (en comparación con las concentraciones óptimas para el crecimiento *in vitro*) donde los microorganismos viven en microhábitats discretos (Nannipieri *et al.*, 2003). La arquitectura de la extensa red de poros del suelo formada por minerales, materia orgánica, hifas fúngicas, raíces, residuos vegetales y la mesofauna permiten la coexistencia de numerosos microhábitats en estrecha proximidad, los cuales varían en la presencia o ausencia de agua, oxígeno, pH, potencial redox, temperatura y concentraciones de nutrientes como así también de contaminantes (Heuer y Smalla, 2012). Las características biológicas, físicas y químicas de los mismos difieren tanto en tiempo como en

INTRODUCCIÓN GENERAL

espacio, y la escala está determinada principalmente por el tamaño del organismo (Nannipieri *et al.*, 2003). Las bacterias se presentan en el suelo formando microcolonias, es decir, pequeños agregados de células que pueden ser considerados como biofilms (Heuer y Smalla, 2012). Estos biofilms, altamente estructurados, están constituidos por comunidades embebidas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) producidas por la misma comunidad. Las bacterias en los biofilms exhiben propiedades “emergentes”, que difieren sustancialmente de las células de vida libre, produciéndose interacciones específicas entre células que les permiten generar y mantener condiciones adecuadas para la coexistencia y el éxito ecológico (Flemming *et al.*, 2016). El suelo puede compararse con un terreno desolado con algunos “oasis” ocupados por microorganismos, denominados “*hot spots*” y en los cuales se encuentran las condiciones óptimas para la vida microbiana (energía y fuentes de nutrientes, temperatura, pH, etc.) (Nannipieri *et al.*, 2003).

- Existe una alta diversidad biológica, en parte explicada por la notable heterogeneidad de microhábitats presentes en el suelo, tal como se mencionó en el punto anterior. La utilización de nuevas técnicas moleculares independientes de cultivo, como las tecnologías de secuenciación de última generación (NGS), han revelado una diversidad bacteriana asombrosa indicando que la diversidad del suelo y de los microbiomas de la rizosfera ha sido notablemente subestimada durante mucho tiempo. A modo de ejemplo, 1 g de suelo puede contener hasta 10^{10} células bacterianas y una diversidad de especies estimada entre $4 \cdot 10^3$ (Torsvik *et al.*, 1990) y $5 \cdot 10^4$ (Roesch *et al.*, 2007). La tecnologías de secuenciación de última generación (NGS) han demostrado que sólo una pequeña fracción de las especies bacterianas existentes (cerca del 5%) han podido ser cultivadas y que una proporción significativa de los taxones bacterianos detectados por estas tecnologías no tienen aún representantes aislados en medios de cultivo (Mendes *et al.*, 2013).
- Las partículas reactivas en la superficie de la fase sólida del suelo pueden adsorber compuestos orgánicos incluyendo importantes moléculas biológicas como enzimas y ácido nucleicos retardando su degradación por microorganismos que habitan en el suelo. Un ejemplo de ello lo constituyen las enzimas extracelulares adsorbidas en minerales que conforman la fracción de arcilla o que están atrapadas en moléculas húmicas y que pueden mantener su actividad al ser protegidas de la proteólisis y de la desnaturalización térmica o por pH. De la misma manera, las moléculas de ADN

adsorbidas o unidas a moléculas húmicas son protegidas del ataque por nucleasas pero pueden transformar aún células competentes, las cuales pueden adquirir todos o partes de los genes asociados con el ADN extracelular (Nannipieri *et al.*, 2003).

2.1 Diversidad microbiana en el suelo

En términos generales, se entiende como diversidad biológica de un ecosistema a la variedad de especies presentes en él como así también la variabilidad genética dentro de cada una de las especies. La diversidad microbiana es normalmente definida como el número de diferentes taxones (riqueza) y la distribución de los microorganismos, es decir, la abundancia relativa de los diferentes grupos (equitatividad o *evenness*) (Kennedy y Smith, 1995). Como se mencionó anteriormente, las comunidades microbianas del suelo son extremadamente diversas. En uno de los primeros estudios sobre el tema, Torsvik *et al.* (2002) estimaron que el número de especies bacterianas en un gramo de suelo forestal se acercaba a las 10.000. Posteriormente, en un estudio metagenómico se contabilizaron en base a estimadores de diversidad, unas 52.000 unidades operativas taxonómicas (OTUs), a partir de 139.819 secuencias bacterianas (Roesch *et al.*, 2007).

La capacidad de un ecosistema de soportar disturbios extremos puede depender en parte de la diversidad existente en el sistema (Kennedy y Smith, 1995). A pesar de que los microbiólogos han estado investigando el impacto de la diversidad microbiana en la estabilidad de las funciones ecosistémicas desde 1960, actualmente existe un interés particular sobre los efectos que esta diversidad tiene sobre funciones ecológicas específicas y sobre la resiliencia a disturbios en los ecosistemas edáficos (Garbeva *et al.*, 2004). Las comunidades microbianas genéticamente más diversas tienen más probabilidad de contener taxones con características complementarias y con un rápido crecimiento compensatorio luego de un disturbio, lo cual puede promover una mayor resiliencia (Shade *et al.*, 2012). Más aún, ciertos estudios han documentado la relación existente entre el grado con el que el suelo puede suprimir ciertas enfermedades vegetales y la diversidad o abundancia de las comunidades microbianas del suelo (Berendsen *et al.*, 2014).

2.2 La rizosfera y su microbioma

La rizosfera se define como la zona o compartimiento del suelo que rodea a la raíz, estrechamente asociada e influenciada por ella, donde los procesos microbianos son dirigidos fundamentalmente por la exudación de sustratos simples y complejos (Badri y Vivanco, 2009). Es un lugar clave para la vida de muchos microorganismos y los procesos que ellos desempeñan ("*hot spot*") y es considerado uno de los ecosistemas más complejos de la Tierra (Mendes *et al.*, 2013). El número de células por gramo de raíz puede exceder

INTRODUCCIÓN GENERAL

las 10^{11} células, mientras que en esa misma cantidad de raíz pueden encontrarse más de 30.000 especies de procariotas (Berendsen *et al.*, 2012).

Un número creciente de estudios indican que muchos microorganismos de la rizosfera pueden influir en la germinación de las semillas y en el vigor de plantas jóvenes como así también en el crecimiento, desarrollo, nutrición y control de enfermedades en plantas, incrementado la productividad de los cultivos (Mendes *et al.*, 2013). En forma análoga a la terminología utilizada para microorganismos que colonizan el cuerpo humano, se designa a las comunidades de microorganismos asociadas a la planta como el microbioma de las plantas o su “segundo genoma” (Berendsen *et al.*, 2012; Mendes *et al.*, 2013). De hecho, el número de genes microbianos en la rizosfera supera al número de genes de la planta. Se ha propuesto que las plantas pueden ser imaginadas, entonces, como “superorganismos” dado que dependen en parte de su microbioma para funciones específicas (Mendes *et al.*, 2013). A su vez, los microorganismos presentes en la rizosfera reciben los productos de la fijación fotosintética del carbono que son exudados a través de las raíces. Estos compuestos, junto con otros rizodepósitos, no sólo nutren a las comunidades microbianas sino que influyen en su actividad y su composición. Esto se conoce como “efecto de la rizosfera” (“*the rhizosphere effect*”) (Berendsen *et al.*, 2014). De hecho, la especie vegetal es determinante en su microbiota rizosférica ya que puede influenciar notablemente su composición y actividad. Las diferencias en la morfología de la raíz como sí también las cantidades y tipo de rizodepósitos entre plantas contribuyen fuertemente a este efecto especie–específico (Kowalchuk *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2006; Haichar *et al.*, 2008; Dias *et al.*, 2012). Estos rizodepósitos (exudados y mucílagos) son reconocidos como una de las principales fuerzas conductoras en la regulación de la diversidad y de la actividad de las comunidades microbianas presente en las raíces (Philippot *et al.*, 2013; Mendes *et al.*, 2013). Cook *et al.* (1995) postularon originalmente que las plantas podrían modular el microbioma de la rizosfera de acuerdo a sus beneficios estimulando selectivamente aquellos microorganismos que son beneficiosos para su salud y crecimiento. Otros autores, en cambio, argumentaron que la liberación de los exudados constituye sólo un fenómeno pasivo (Hartmann *et al.*, 2009; Dennis *et al.*, 2010). Más allá del rol fundamental de los exudados en la selección de microorganismos de la rizosfera y en la modulación de la estructura y actividad de las comunidades microbianas rizosféricas, se desconoce aún si las plantas usarían los exudados para buscar “intencionalmente” la ayuda de ciertos microorganismos o si lo hacen simplemente como una “descarga” sin ningún propósito inmediato (Mendes *et al.*, 2013). Los conceptos mencionados en esta sección serán retomados en la discusión del Capítulo 4, el cual aborda el estudio del impacto del herbicida a nivel de la microbiota rizosférica.

2.3 Importancia del suelo en los ecosistemas. El rol de la microbiota

Un ecosistema es un sistema ambiental complejo determinado por la interacción de los organismos vivos de una comunidad entre sí y con los elementos abióticos (físicos y químicos) de un determinado lugar. Los organismos del suelo tienen un rol central en los diversos procesos que contribuyen a la provisión de un amplio rango de servicios ecosistémicos (*EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues*, 2016). De acuerdo con Millenium Ecosystem Assessment, los servicios ecosistémicos pueden ser clasificados en aquellos asociados con la provisión de bienes (ej.: comida, fibras, combustibles, agua), aquellos que sustentan la vida del planeta (formación del suelo, ciclado de nutrientes, polinización, control de inundaciones), aquellos que derivan de la regulación de los procesos ecosistémicos (control climático, control de enfermedades, destoxificación) y aquellos servicios culturales no asociados directamente a beneficios materiales (ej.: recreación) (Millenium Ecosystem Assessment, 2005). El suelo es capaz de contribuir a las cuatro dimensiones de los servicios ecosistémicos (Barrios, 2007).

Las prácticas agrícolas pueden afectar la capacidad de los ecosistemas de proveer bienes y servicios. Así, por ejemplo, las aplicaciones de altas dosis de pesticidas y fertilizantes pueden incrementar los niveles de nutrientes y toxinas en napas y aguas superficiales, con un costo tanto para la salud humana como para los sistemas de purificación. Asimismo, ciertas prácticas agrícolas degradan la calidad del suelo, contribuyen a la eutrofización de los ambientes acuáticos y requieren cada vez mayor fertilización y energía para mantener la productividad de los suelos degradados. Aquellas prácticas que modifican la composición de especies o reducen la biodiversidad pueden reducir la provisión de bienes y servicios ecosistémicos dado que la capacidad de los ecosistemas de proveer ciertos servicios depende tanto del número como del tipo de especies presentes en él (Tilman *et al.*, 2002).

En esta Tesis en particular se hará referencia principalmente a las comunidades microbianas del suelo desde su rol central en los servicios ecosistémicos en ambientes agrícolas, como sustento de la vida y como reguladoras de los procesos ecosistémicos. Los procesos biológicos y bioquímicos que ocurren en el suelo son de suma importancia para la función y equilibrio de los ecosistemas, y están directamente relacionados con las diferentes funciones del suelo. La comunidad de microorganismos que habita el suelo está compuesta por miles de especies que en conjunto realizan procesos fundamentales para su propia existencia y para la vida de otras especies. Los microorganismos del suelo son críticos para el mantenimiento de las funciones del mismo tanto en suelos prístinos como en suelos agrícolas debido a su involucramiento en procesos claves como la formación de la

INTRODUCCIÓN GENERAL

estructura, la descomposición de la materia orgánica y el ciclado del carbono, nitrógeno, fósforo y azufre, y la remoción de toxinas y contaminantes (Nannipieri *et al.*, 2003; van der Heijden *et al.*, 2008; Ahemad y Kibret, 2014). Asimismo, los microorganismos edáficos juegan un rol muy importante en la supresión de diversas enfermedades vegetales ocasionadas por patógenos que se encuentran en el suelo, en la promoción del crecimiento vegetal y en distintos cambios en la vegetación (Garbeva *et al.*, 2004). Son importantes reguladores de la productividad vegetal, especialmente en ecosistemas pobres en nutrientes donde los simbioses son responsables de la adquisición de los nutrientes limitantes. Las bacterias fijadoras de nitrógeno y las micorrizas son responsables de un 5-20% (pastizales y sabanas) a un 80% (bosques templados y boreales) de todo el nitrógeno y hasta un 75% del fósforo que es adquirido anualmente por las plantas, respectivamente. Los microorganismos de vida libre del suelo también regulan fuertemente la productividad vegetal no sólo a través de la mineralización y liberación de nutrientes, sino a través de la propia competencia por estos compuestos requeridos por las plantas. La dinámica de las comunidades de plantas y la diversidad de las mismas es también dependiente de los microorganismos del suelo incluyendo diversos patógenos. Estimaciones conservativas sugieren que alrededor de 20.000 especies de plantas son completamente dependientes de simbioses microbianos para el crecimiento y supervivencia, remarcando la importancia de los microorganismos del suelo como reguladores de la riqueza de plantas en el planeta (van der Heijden *et al.*, 2008). Las interacciones planta-microorganismos que ocurren a nivel de la rizosfera son capaces de influenciar comunidades por encima de la superficie terrestre. Esto es posible tanto por el efecto de la interacción a nivel de nutrición de la planta como así también a nivel de respuestas de defensa. Así, por ejemplo, la respuesta a la herbivoría puede depender de la interacción de la planta con micorrizas. De la misma manera, la respuesta sistémica inducida por rizobacterias (*Bacillus* y *Pseudomonas* spp., entre otras) puede limitar el ataque de patógenos activando mecanismos de defensa. Por lo tanto, los miembros de la microbiota rizosférica pueden ejercer una influencia notable sobre el metabolismo de la planta y la resistencia a patógenos (Philippot *et al.*, 2013).

3. Respuesta de las comunidades microbianas del suelo a perturbaciones

En las secciones anteriores se introdujeron conceptos importantes generales acerca del suelo y otros más detallados relacionados con el suelo como sistema biológico y en especial sobre su microbiota. En esta sección se hará referencia a un aspecto fundamental de las comunidades microbianas del suelo en interacción con el ambiente: la estabilidad de las mismas frente a distintos disturbios o factores de estrés a los que se ven sometidas.

3.1 Definición ecológica de perturbación, disturbio y estrés

Para poder comprender cómo responden las comunidades microbianas a las diferentes perturbaciones a las que se enfrentan de manera recurrente, es necesario definir a qué nos referimos cuando hablamos de perturbaciones a nivel de comunidad. De acuerdo con Bender *et al.* (1984), las perturbaciones son “alteraciones selectivas de la densidad de uno o más miembros de la comunidad”. Otros autores no se refieren a perturbaciones sino a “disturbios”, definiéndolos como todos aquellos eventos, de origen biótico o abiótico, que alteran el entorno inmediato de la comunidad y repercuten de esta manera en forma indirecta o bien alteran directamente la comunidad. Luego de un disturbio, los miembros de la comunidad pueden morir o bien puede producirse un cambio en la abundancia relativa de los mismos. Pueden ocurrir disturbios en distintas escalas temporales y espaciales, con diferentes frecuencias (número de eventos por unidad de tiempo), intensidades (magnitud del disturbio), extensiones (proporción del ecosistema afectado) y periodicidades (regularidad de los eventos) (Shade *et al.*, 2012). La utilización del término disturbio de un modo general en lugar de “perturbaciones” puede resultar confusa dado que, como se indica a continuación, un disturbio sostenido y de larga duración no es considerado disturbio sino estrés (Borics *et al.*, 2012).

Dependiendo de la duración, las perturbaciones pueden ser clasificadas en “pulsos” o “presiones”. Las de tipo “pulso” corresponden a eventos discretos, de corta duración, mientras que aquellos continuados y de larga duración reciben el nombre de “presiones” (Bender *et al.*, 1984). Esta forma de clasificación de los disturbios es relativa al tiempo de generación de la comunidad de interés. Por ejemplo, en el caso de las comunidades microbianas, un disturbio que podría ser de tipo pulso para organismos superiores puede resultar en una presión (Shade *et al.*, 2012).

En relación a lo presentado en el párrafo anterior, es importante destacar que la frecuencia ha sido propuesta por otros autores como el factor de diferenciación entre dos términos frecuentemente utilizados: “disturbio” y “estrés”. Aquellas perturbaciones que ocurren de manera periódica u ocasional (tiempo entre eventos > tiempo de recuperación) y que resultan en un cambio del sistema pero con la posibilidad de que se produzca una recuperación, corresponden a disturbios. En cambio, un estrés implica una perturbación continua o que ocurre frecuentemente (tiempo entre eventos < tiempo de recuperación), donde como consecuencia del impacto el sistema no se recupera y la variable del sistema no alcanza su nivel base (Borics *et al.*, 2012).

Considerando las definiciones presentadas, y con la intención de unificar términos y evitar confusiones, el término “disturbio” se reservará exclusivamente para referirse a

perturbaciones de tipo “pulso” o de corta duración, mientras una perturbación de tipo “presión”, sostenida o de mayor frecuencia, será considerado como un “estrés” (Bender *et al.*, 1984; Borics *et al.*, 2012).

3.2 Estabilidad de las comunidades microbianas: resistencia y resiliencia

La estabilidad de una comunidad está determinada por la resiliencia y la resistencia de la misma frente a un disturbio (Pimm, 1984), dos métricas que son útiles para comparar las respuestas de las comunidades y que han sido ampliamente abordadas en la literatura relacionada con la ecología microbiana (Allison y Martiny, 2008).

La resistencia indica a qué nivel la comunidad es insensible a un disturbio (Pimm, 1984). La resiliencia de una comunidad, por su parte, se define como su capacidad de retornar a las condiciones previas al disturbio o a un nuevo “estado estable” luego de que éste desaparece (Griffiths y Philippot, 2012). Está relacionada con la tasa a la cual la comunidad retorna a su estado pre-disturbio o a la nueva condición de estabilidad (Pimm, 1984).

Existen diferentes características de los microorganismos, en especial de Bacteria y Arquea, que indican que la resiliencia podría ser un fenómeno común en las comunidades de las que forman parte. En primer lugar, muchos microorganismos tienen tasas de crecimiento rápidas: si la abundancia disminuye por un disturbio, tienen la capacidad de recuperarse rápidamente. En segundo lugar, tienen un alto grado de flexibilidad o plasticidad fisiológica, no observable en el dominio Eucariota. Esto permite que si la abundancia relativa de ciertos taxones disminuye inicialmente, luego dichos taxones puedan adaptarse fisiológicamente a las nuevas condiciones abióticas a lo largo del tiempo y retornar a su abundancia original. Por último, aun si la adaptación fisiológica no es posible, la rápida evolución a través de mutaciones y de la transferencia horizontal de genes (THG) pueden permitir la adaptación y recuperación luego del disturbio. Si bien se asume una disminución de la abundancia en los casos mencionados, debe tenerse en cuenta que ciertos taxones pueden verse beneficiados también e incrementar su abundancia. Por lo tanto, para que se pueda producir una recuperación de ciertos grupos, aquellos que responden positivamente deberán disminuir su abundancia para permitir que la comunidad vuelva a la composición original (Allison y Martiny, 2008).

3.3 Redundancia funcional

Las revisiones de la literatura existente indican claramente que las comunidades microbianas son sensibles a los disturbios y no siempre se recuperan rápidamente hacia su estado original (Allison y Martiny, 2008; Shade *et al.*, 2012). Esto despierta el interrogante de si los cambios en la composición afectan o no las funciones de la comunidad. En este punto

INTRODUCCIÓN GENERAL

es importante destacar que existen dos razones por las cuales los cambios en la composición pueden no afectar los procesos que se llevan a cabo (Allison y Martiny, 2008):

- La nueva comunidad puede contener taxones funcionalmente redundantes respecto de los presentes en la comunidad original.
- La nueva comunidad puede llevar a cabo funciones diferentes pero resultar en una misma velocidad del proceso total.

Los caminos posibles luego de una perturbación, determinados por la resiliencia, resistencia y redundancia funcional, se indican en la Figura 2.

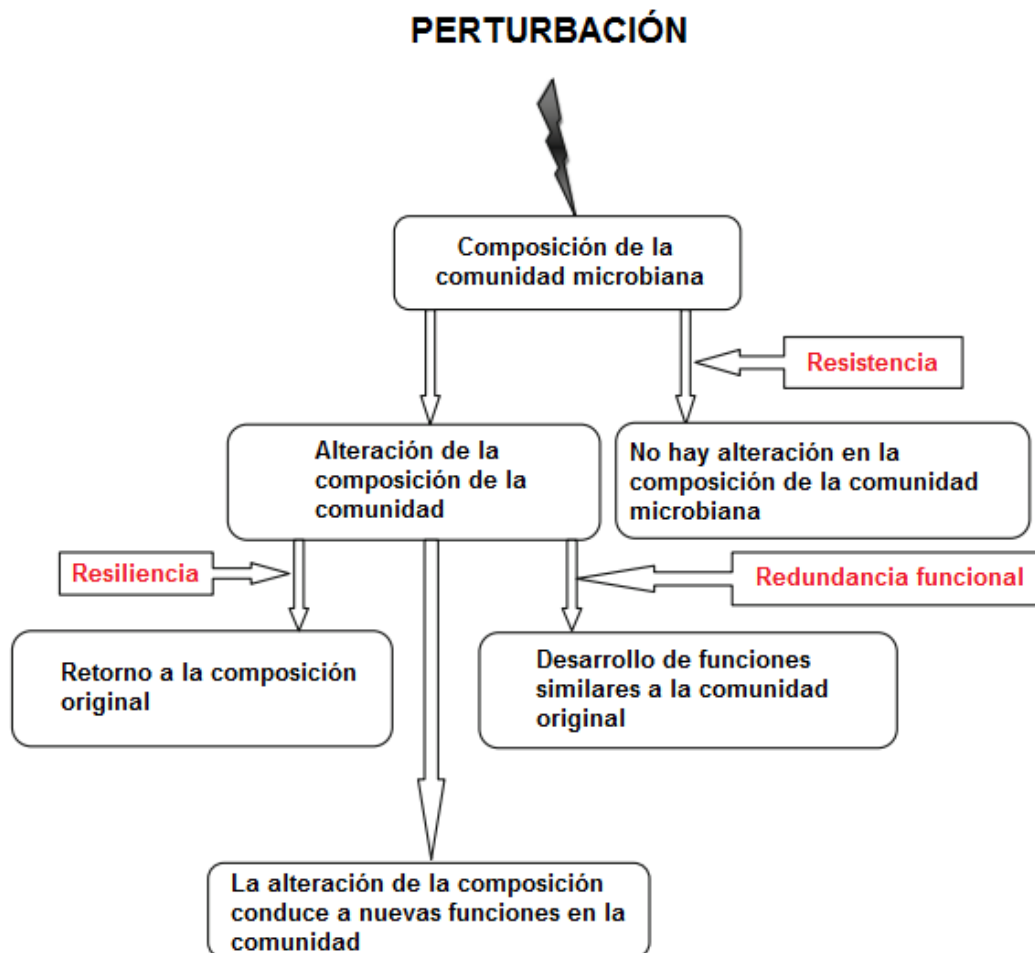


Figura 2. Caminos posibles de respuesta luego de producirse una perturbación en comunidades microbianas. Modificado de Allison y Martiny (2008).

3.4 Propiedades biológicas que contribuyen a la resistencia y resiliencia microbiana

Las comunidades microbianas presentan un gran número de características que explican su notable capacidad de adaptarse a condiciones cambiantes y que las diferencian de las comunidades de organismos superiores. Algunas confieren ventajas competitivas frente a disturbios, mientras que otras lo hacen frente a disturbios prolongados o estreses. Si bien

existen un gran número de propiedades que se presentan a diferentes niveles (individuo, población y comunidad) (Shade *et al.*, 2012), a continuación se describen algunas de las propiedades más importantes observadas a nivel de población y de comunidad:

3.4.1 Propiedades a nivel de población

- **Evolución adaptativa**

Los microorganismos se caracterizan por su rápido crecimiento, altas densidades poblacionales, altas tasas de mutación y son capaces de recombinación a través de la transferencia horizontal de genes (THG). Los disturbios pueden proveer entonces una presión de selección que conduzca a la diversificación (Cohan, 2002). La evolución rápida es un mecanismo importante para la resistencia de la comunidad tanto en el aspecto funcional y en su composición frente a ciertos disturbios, como así también para la resiliencia. Es particularmente importante en la respuesta al estrés (Cohan, 2002).

- **Tasa de crecimiento**

La tasa de crecimiento puede ser importante para la resiliencia en comunidades microbianas luego de ciertos disturbios, donde unos pocos microorganismos que sobreviven pueden disparar el crecimiento que permita recuperar los tamaños de población previos al disturbio. Estos microorganismos serán aquellos que poseen la capacidad de responder y multiplicarse más rápidamente una vez que las condiciones vuelven a ser favorables. En cambio, aquellos que presenten una menor tasa de crecimiento pero que maximicen la eficiencia de uso de recursos incrementarán la resistencia a estreses cuando empiecen a escasear los nutrientes (Shade *et al.*, 2012). Uno de los ejemplos más claros de ello se presenta a nivel de comunidades de suelo rizosférico y no rizosférico. En el suelo rizosférico, donde los exudados radicales aportan altos niveles de nutrientes, existe una dominancia de bacterias que están adaptadas a crecer rápidamente en presencia de las altas concentraciones de sustratos. Estas poblaciones de bacterias dominantes en la rizosfera son capaces de incrementar su número rápidamente y tornarse más competitivas cuando el aporte de nutrientes orgánicos son altos, pero declinan rápidamente en número cuando los nutrientes escasean. Reciben el nombre de zimógenos, copiótrofos o estrategias-*r*. En cambio, en el suelo no rizosférico existe una gran diversidad de bacterias cultivables cuyos requerimientos nutricionales son satisfechos por compuestos extraíbles en la materia orgánica en reemplazo de

azúcares simples, aminoácidos u ácidos orgánicos. Estas bacterias se denominan autóctonas, oligotróficas o estrategias-K, y exhiben el comportamiento opuesto a los estrategias-r, son competitivamente exitosos y presentan baja mortalidad en ambientes con déficit nutricional debido a su adaptación a la eficiente extracción e incorporación de nutrientes, a la conversión de la materia orgánica del suelo en biomasa y a la síntesis/utilización de polímeros de reserva (Schmidt y Schaechter, 2011). En síntesis, el compromiso entre la tasa de crecimiento y la eficiencia de uso de recursos puede determinar la capacidad de las poblaciones microbianas de responder a disturbios.

3.4.2 Propiedades a nivel de comunidad

- **Diversidad**

La diversidad puede influenciar la respuesta de las comunidades a los disturbios. Si bien se ha determinado que aspectos de la diversidad alfa como riqueza y equitatividad pueden incrementar la resiliencia de las comunidades de organismos superiores, las evidencias en el caso de comunidades microbianas no son del todo concluyentes y hay evidencias en ambos sentidos por lo que el concepto es todavía ampliamente debatido (Griffiths *et al.*, 2000; Wertz *et al.*, 2007; van Elsas *et al.*, 2012). Varios experimentos de remoción, donde diferentes taxones microbianos son removidos sucesivamente de la comunidad original a través de determinados agentes químicos o diluciones de la comunidad, han demostrado que el funcionamiento de la misma puede permanecer inalterado luego de producirse una fuerte reducción de la diversidad microbiana al igual que su estabilidad (Griffiths *et al.*, 2001; Wertz *et al.*, 2007).

Más allá de estas observaciones, debe resaltarse que el mecanismo con el que tradicionalmente se ha explicado la relación positiva entre diversidad y resiliencia está relacionado con el concepto de “*efecto buffer*”, lo que se conoce en inglés como “*Insurance Hypothesis*”: en comunidades microbianas más diversas existen mayores probabilidades de encontrar taxones microbianos con caracteres complementarios o iguales, que permitan responder con un crecimiento compensatorio rápido ante un disturbio, promoviendo la resiliencia (Griffiths y Philippot, 2012). Cuanto mayor sea la diversidad microbiana y la redundancia funcional, más rápidamente podrá retornar el sistema a la condición estable inicial luego de una exposición a un estrés o disturbio. Este concepto es ampliamente debatido actualmente como se indicó con anterioridad.

- **Turnover y modificación direccional de la comunidad**

Uno de los factores que determina cuán rápidamente tiene lugar la recuperación de la comunidad microbiana frente a un disturbio es el reemplazo y la sustitución de sus miembros en un gradiente ambiental o a lo largo del tiempo. Estos procesos son determinados por el crecimiento de las poblaciones. En algunos casos, existen cambios direccionados como es el caso de la microbiota intestinal frente a tratamientos con antibióticos pero en otros casos las trayectorias de las comunidades no son claras (Shade *et al.*, 2012).

3.5 Tolerancia de la comunidad inducida por el contaminante (PICT)

Luego de una perturbación, los miembros de la comunidad pueden morir o bien puede producirse un cambio en la abundancia relativa. Asimismo, para perturbaciones que se presentan de manera continuada en el tiempo, la rápida evolución de características de una población puede influenciar la dinámica temporal de las comunidades microbianas, conduciendo a la adaptación y a la diversificación. Cuando tiene lugar una exposición prolongada a un contaminante, una de las respuestas de la comunidad que frecuentemente puede observarse es el incremento de la tolerancia al compuesto químico. En ecotoxicología esto se conoce como tolerancia de la comunidad inducida por el contaminante (*Pollution Induced Community Tolerance* o PICT) (Blanck *et al.*, 1988). El concepto PICT se basa en un principio simple: los miembros de una comunidad sobreviven en un ambiente contaminado sólo si son tolerantes al contaminante. Los contaminantes no afectan a la biota de forma aleatoria, sino que favorecen a aquellas especies capaces de tolerar la toxicidad del compuesto, forzando a la comunidad a un incremento en su tolerancia, es decir, una selección direccionada (Blanck, 2002). Los organismos más tolerantes en la comunidad podrán sobrevivir y superar a los más sensibles, resultando en un incremento en la tolerancia promedio de la comunidad luego de una exposición sostenida en el tiempo. La observación de una mayor tolerancia es considerada entonces una fuerte evidencia de que el contaminante ha ejercido un efecto sobre la comunidad (Demoling y Bååth, 2008). Por lo tanto, el concepto PICT ha sido propuesto como una herramienta ecotoxicológica a nivel de comunidad para evaluar los efectos de un determinado contaminante presente en el ecosistema.

3.6 Costo de tolerancia: susceptibilidad a nuevas perturbaciones

La aproximación basada en el concepto PICT utiliza el incremento en la tolerancia de las comunidades como un indicador del efecto del contaminante. Sin embargo, los estudios de ecotoxicología comparativa también se han empleado para determinar las consecuencias de

un incremento en la tolerancia, en base a observaciones que indican que la aclimatación o adaptación a un set de estresores ambientales puede conllevar un costo relacionado con el incremento de la susceptibilidad a otros estresores (Wilson, 1988; Clements, 1999; Azarbad *et al.*, 2016). Si bien la densidad poblacional puede eventualmente retornar a niveles previos al disturbio luego de la remoción o degradación del contaminante, la diversidad genética reducida y la menor resiliencia podrían perdurar por varias generaciones, incrementando la posibilidad de que se produzca el cambio hacia una condición estable diferente a la de la comunidad original. De hecho, se conoce que los disturbios repetidos en sistemas que se encuentran en recuperación frente a perturbaciones antropogénicas podrían tener efectos crípticos y de larga duración (Paine *et al.*, 1998).

4. Indicadores del estatus biológico de comunidades microbianas del suelo

En las secciones anteriores se hizo referencia al suelo como sistema biológico y a las respuestas de las comunidades microbianas frente a perturbaciones, indicando que la estabilidad de las comunidades microbianas está determinada por la resistencia y resiliencia de las mismas frente a disturbios. Estas propiedades son las que definen si el sistema cambiará o si retornará a su estado original (Griffiths y Philippot, 2012). El cambio de la comunidad puede producirse a nivel funcional y/o estructural y puede afectar las funciones del suelo en el ecosistema. En este sentido, el estudio del impacto de pesticidas o de ciertas prácticas sobre el suelo requiere de medidas que indiquen si han ocurrido cambios en el sistema (indicadores). Sólo un seguimiento adecuado permite identificar estos cambios y actuar en consecuencia para que el sistema retorne a su estado original. Esto podría lograrse por ejemplo, disminuyendo la intensidad de la perturbación o su frecuencia, sobre todo considerando que es más probable el cambio hacia un nuevo estado estable en perturbaciones que presentan alta frecuencia (estreses) (Borics *et al.*, 2012; Shade *et al.*, 2012). Más aún, la propia resiliencia puede verse afectada por la exposición crónica a determinadas perturbaciones (Clements y Rohr, 2009). De todo ello se deduce, entonces, la importancia de estudiar el impacto de determinadas prácticas sobre el estatus biológico de las comunidades microbianas.

Los indicadores han sido definidos como “parámetros microbianos que representan propiedades del ambiente o impactos sobre el mismo, que pueden ser interpretados más allá de la información que ese parámetro medido u observado represente por sí mismo” (Nielsen y Winding, 2002). El concepto de indicador se encuentra estrechamente relacionado con los conceptos de “calidad” y “salud” de suelos, asociados a las múltiples funciones del mismo en los ecosistemas, tal como se menciona a continuación.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La “calidad” del suelo ha sido definida en un sentido ecológico amplio como “la capacidad del mismo de funcionar con su ecosistema y su uso, sustentando la productividad biológica, la calidad del ambiente, la salud de las plantas, animales y poblaciones” (Doran y Parkin, 1994). Posteriormente, Doran y Safely (1997) la definieron, considerando la naturaleza dinámica y continua del suelo, como la “capacidad del suelo de funcionar en forma continuada como un sistema vital viviente de acuerdo con los límites de los ecosistemas y de manejo de la tierra, de sustentar la productividad biológica, promover la calidad del aire y del agua, y mantener la salud animal, humana y de las plantas”. En un sentido amplio, la calidad del suelo es considerada como un indicador integral de calidad del ambiente, de seguridad alimentaria y de viabilidad económica y por lo tanto podría servir como un buen indicador para monitorear el manejo sustentable de la tierra (Herrick, 2000). Más recientemente, se ha introducido también el concepto de un suelo saludable como parte del concepto de calidad del suelo, definiéndose al mismo como un sistema estable con altos niveles de diversidad biológica, actividad, ciclado de nutrientes y resiliencia a disturbios (van Bruggen *et al.* 2006).

En sentido estricto, mediante indicadores podrían identificarse cambios en el estado de la comunidad microbiana que repercutan sobre ciertas funciones o la estructura de la comunidad, es decir, determinar si existe un cambio en el sistema y la magnitud del cambio, pero ello podría no ser suficiente para referirse a un cambio en la “calidad” del suelo. Por este motivo, en esta Tesis se hará referencia a ellos particularmente como indicadores de “estado” de la comunidad y no de “calidad” o “salud” del suelo.

4.1 Propiedades de los indicadores microbiológicos y métodos utilizados

Como se indicó en secciones anteriores, resulta indispensable disponer de un conjunto de indicadores fiables y relevantes, entendiéndose como indicador a un atributo cuya medida cuantifica el grado de cambio de un sistema. La bondad de su uso depende de su sensibilidad y del entendimiento que se tenga de él (Conti y Giuffré, 2011).

Varios parámetros biológicos han sido utilizados para evaluar cómo se afecta el suelo por diferentes prácticas agrícolas (Anderson, 2003). Entre ellos, los parámetros relacionados con los microorganismos y sus funciones han sido reconocidos como componentes integrales de calidad del suelo dado sus importantes roles en el funcionamiento del ecosistema y su capacidad de responder rápidamente a cambios ambientales. Son muy sensibles a perturbaciones externas y pueden responder rápidamente a ellas debido a sus cortos tiempos de generación y su íntima relación con el entorno dada la alta relación superficie:volumen (Zabaloy *et al.*, 2011).

INTRODUCCIÓN GENERAL

Algunos indicadores como respiración microbiana, C y N de la biomasa microbiana, actividad enzimática y recuento de bacterias totales, entre otros, no permiten obtener información sobre cambios en grupos específicos de microorganismo dado que integran la respuesta de toda la comunidad. Estos indicadores, relacionados con metodologías clásicas de bioquímica y microbiología de suelos, han sido designados con diversos nombres en la literatura según diferentes autores, entre ellos “*whole community-level endpoints*” (Zabaloy *et al.*, 2011), “*broad-scale integrative methods*” (Newman *et al.*, 2016a) o simplemente “*classical microbial parameters*” (Babujia *et al.*, 2016). Se caracterizan por su escasa resolución. Si bien los métodos integradores son necesarios debido a que proporcionan información importante sobre el funcionamiento de toda la comunidad (ej.: respiración, actividad enzimática, etc.), pueden ser muchas veces insensibles en la detección de cambios en poblaciones o en la actividad de pequeñas subpoblaciones (Duke *et al.*, 2012).

Otros indicadores, en cambio, se relacionan con la estructura de la comunidad, es decir, con la composición y/o abundancia de diferentes grupos microbianos y por lo tanto permiten obtener información sobre qué grupos en particular dentro de esa comunidad podrían experimentar modificaciones. Entre estos indicadores de mayor resolución se encuentran los perfiles fisiológicos, bioquímicos y genéticos o basados en ADN (Zabaloy *et al.*, 2011). Dado que estos perfiles están determinados por la composición de la comunidad bajo estudio, presentarán variaciones entre distintas muestras de acuerdo a la presencia/ausencia de ciertos grupos microbianos y a la abundancia de los mismos en cada caso en particular. Es decir, se comportan como “huellas dactilares” (“*fingerprints*”). Entre los métodos más utilizados en ecología microbiana se encuentran la electroforesis en gel con gradiente de desnaturizante (DGGE) para la obtención de perfiles en base a genes específicos previamente amplificados por PCR (Muyzer *et al.*, 1993); el sistema Biolog (Garland y Mills, 1991) y el sistema BDOBS (Wodnicka *et al.*, 2000) para la obtención de perfiles fisiológicos, y el análisis de ácidos grasos fosfolipídicos (PFLA) para la obtención de perfiles bioquímicos (Drenovsky *et al.*, 2004a). En el Capítulo 2 se recurrirá específicamente a los perfiles basados en ADN (DGGE) para el estudio de impacto de glifosato en comunidades de bacterias nitrificantes, mientras que en el Capítulo 4 se presentarán perfiles de DGGE de *Betaproteobacteria* en la rizosfera. Los perfiles fisiológicos se presentarán como metodología de estudio en los Capítulos 1 y 4.

Dentro de las metodologías de mayor resolución más recientemente utilizadas en estudios de impacto de herbicidas se encuentran aquellas basadas en secuenciación masiva utilizando las nuevas tecnologías de secuenciación conocidas como “*Next Generation Sequencing*” (NGS) a partir de metagenomas de muestras de suelo. La

INTRODUCCIÓN GENERAL

secuenciación de amplicones del gen que codifica para la subunidad ribosomal mayor (16S), conocida en inglés como *metabarcoding*, es una de las metodologías más utilizadas y es la que se describirá a continuación. Estas metodologías permiten hacer estudios comparativos y detectar cambios con el mayor grado de resolución a nivel taxonómico. El objetivo de las mismas es caracterizar la diversidad de las comunidades, tanto la diversidad alfa como la diversidad beta. Los análisis de diversidad alfa determinan parámetros intrínsecos de una única comunidad, específicamente la riqueza (número de especies, u OTUs cuando se trabaja con secuencias derivadas de NGS), la equitatividad (abundancia relativa de las especies) y la diversidad (comprende los dos anteriores, es decir, la cantidad de especies y como están distribuidas, siendo los estimadores más populares para esta métrica los índices de Shannon-Weaver y de Simpson) (Kennedy y Smith, 1995). Para que los valores de las métricas de diversidad alfa sean comparables entre muestras, es necesario que el esfuerzo de muestreo (en este caso, la cantidad de secuencias analizadas) haya sido similar. Con esta finalidad, se construyen las llamadas “curvas de rarefacción” determinando el valor que adopta una métrica ecológica a diferentes esfuerzos de muestreo. Son curvas de acumulación que muestran un crecimiento exponencial al principio y que tienden a un valor asintótico. Cuando una comunidad ha sido completamente muestreada, por más que se adicionen más secuencias al análisis, éstas repiten a otras anteriores obteniéndose un valor constante de la métrica evaluada. Aún cuando el esfuerzo de muestreo no haya sido parejo entre diferentes muestras, las mismas pueden ser comparadas para aquellos puntos en los que haya suficiente cantidad de secuencias de cada muestra en la comparación (Fierer *et al.*, 2012). En el Capítulo 4 de esta Tesis se recurrió a indicadores de este tipo para detectar diferencias en las comunidades microbianas de la rizosfera de *Avena sativa* L. al comparar dos métodos de finalización de este cultivo de cobertura: con glifosato (dsecación) y sin glifosato (corte).

En la Tabla 2 se resumen los indicadores utilizados a lo largo de esta Tesis junto con los métodos asociados empleados a nivel experimental. Asimismo, en las secciones siguientes se describen en mayor detalle cada uno de ellos. Debe destacarse que se trata de métodos independientes del cultivo de microorganismos. La principal ventaja de estos métodos es que permiten incluir en el análisis a microorganismos que no han podido ser aislados y cultivados en el laboratorio eliminando los sesgos asociados a diferencias en la capacidad de cultivo. Alrededor de un 99% de los microorganismos observados microscópicamente en una muestra ambiental no son cultivables bajo las metodologías tradicionales (Hugenholtz, 2002).

INTRODUCCIÓN GENERAL

Tabla 2. Indicadores microbiológicos y metodologías asociadas empleadas en la Tesis. Las referencias corresponden a ejemplos de estudios en comunidades del suelo en los que se emplearon las metodologías y parámetros mencionados.

Metodología utilizada	Parámetro biológico indicador considerado	Referencias	Capítulo en el que se utilizó
Respiración en placas sensoras BDOBS	Respiración inducida por el sustrato (SIR)	Zabaloy <i>et al.</i> (2008) Zabaloy <i>et al.</i> (2012) Zabaloy <i>et al.</i> (2016a)	1, 2, 3 y 4
	Cociente respiratorio (RQ=RB/SIR)		
	Respiración basal (RB)		
Perfiles fisiológicos con varios sustratos carbonados (CLPP)	Equitatividad de uso de sustratos (<i>E</i>) o <i>evenness</i>	Degens <i>et al.</i> (2001)	1 y 4
	Diversidad catabólica (ej.: índice de Shannon-Weaver)	Mijangos <i>et al.</i> (2009)	
PCR + Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalizante (PCR-DGGE)	Coefficiente de correlación de Pearson entre perfiles	Hernández <i>et al.</i> (2010) Montecchia <i>et al.</i> (2011) Zabaloy <i>et al.</i> (2016b)	1, 2, 3 y 4
PCR cuantitativa (qPCR)	Número de copias de genes indicadores específicos	Fierer <i>et al.</i> (2005)	1, 2, 3 y 4
Secuenciación de amplicones del gen del ARNr 16S (<i>metabarcoding</i>)	Diversidad alfa (riqueza, equitatividad y diversidad)	Newman <i>et al.</i> (2016a)	4
	Diversidad beta		
	Abundancia relativa de diferentes taxones		
PCR-Southern blot	Presencia/ausencia de señal de hibridación	Dealtry <i>et al.</i> (2014)	4

4.2 Respiración basal (RB), respiración inducida por el sustrato (SIR) y cociente respiratorio (RQ)

Además de ser una medida ampliamente aceptada de la actividad microbiana total del suelo, la respiración microbiana ha sido utilizada también como un indicador de toxicidad de pesticidas y metales pesados (Anderson, 2003; Yao *et al.*, 2006; Zabaloy y Gómez, 2008).

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las medidas de respiración pueden realizarse en base a la evolución del dióxido de carbono producido o en base al oxígeno que es consumido en la oxidación de los sustratos carbonados por parte de los microorganismos heterótrofos. Las medidas de respiración pueden tener en cuenta sólo la respiración basal (RB), donde no se adicionan fuentes carbonadas o pueden realizarse luego de la adición de un sustrato orgánico en cuyo caso lo que se determina es la respiración inducida por el sustrato (SIR). En el primer caso, a diferencia del segundo, la respiración no está relacionada con la biomasa microbiana (Nannipieri *et al.*, 2003). La SIR es un parámetro sensible y muy utilizado para la detección del impacto de determinados contaminantes en microorganismos del suelo (Brohon *et al.*, 2011). Bajo una condición de exceso de glucosa añadida o de otros sustratos fácilmente utilizables, el metabolismo del sustrato en exceso se encuentra limitado por la cantidad de microorganismos presentes en el suelo. Inicialmente (hasta 6 u 8 horas) no hay crecimiento microbiano y el incremento en la respuesta respiratoria es proporcional a la biomasa microbiana presente inicialmente que es capaz de responder y por lo tanto, utilizar el sustrato proporcionado (Nannipieri *et al.*, 2003). La fracción de la comunidad de mayor respuesta al sustrato y más activa de la comunidad microbiana, correspondiente a la biomasa determinada por SIR (Anderson y Domsch, 1978), es más sensible a contaminantes que la biomasa microbiana total determinada bioquímicamente (Chander *et al.*, 2001; Zabaloy *et al.*, 2008).

Un indicador ampliamente utilizado que se obtiene de la relación entre la RB y la biomasa microbiana es el llamado coeficiente metabólico o qCO_2 (Anderson y Domsch, 1993). Representa la tasa de respiración ($mg\ CO_2-C\ h^{-1}$) por unidad de biomasa ($mg\ C$) y es un indicador, fácilmente determinable, de la eficiencia con que la que los microorganismos utilizan las fuentes de C y energía que controlan el crecimiento microbiano (eficiencia del metabolismo microbiano) (Dilly *et al.*, 2005). El qCO_2 refleja el requerimiento energético de mantenimiento en un determinado momento bajo una dada condición ambiental y el metabolismo catabólico (Anderson, 1994). Es muy utilizado como indicador de requerimiento de energía de mantenimiento de la microbiota del suelo. Bajo condiciones desfavorables, por ejemplo, en presencia de contaminantes como metales pesados, los microorganismos requieren más energía para sustentar la biomasa, por lo tanto, el qCO_2 se incrementa y hay más pérdida de C (Dilly *et al.*, 2005). En esta Tesis se utilizará un cociente respiratorio (RQ), definido como la relación RB:SIR, el cual es adimensional respecto del qCO_2 pero es análogo (Cheng *et al.*, 1996; Zabaloy *et al.*, 2016b) y responde de la misma manera incrementándose frente a condiciones desfavorables (Dilly *et al.*, 2005). La analogía se explica considerando que el término BM en el qCO_2 puede determinarse directamente a

partir de la SIR (Anderson y Domsch, 1978). Por lo tanto, cuando se utiliza un mismo sistema de medición para la RB y la SIR, el qCO_2 es análogo a la relación RB:SIR y puede relacionarse linealmente con el RQ (Cheng *et al.*, 1996).

4.3 Diversidad catabólica: perfiles fisiológicos

La obtención rápida de perfiles multivariados basada en caracteres fisiológicos (*Community Level Physiological Profiles* o CLPP, también conocida como *metabolic fingerprinting*) se desarrolló originalmente en 1991 para comparar las comunidades bacterianas heterotróficas del suelo utilizando el sistema de medición Biolog (Garland y Mills, 1991). A partir de allí, se ha utilizado ampliamente para estudiar la diversidad funcional microbiana en una variedad de ambientes terrestres entre ellos compost (Insam *et al.*, 1996), suelos agrícolas y suelos forestales bajo diferentes manejos (Busse *et al.*, 2001; Gómez *et al.*, 2004; Winding y Hendriksen, 2007) como así también en suelos expuestos a herbicidas (Zabaloy *et al.*, 2008b). Una de las razones por las cuales los perfiles CLPP se han utilizado ampliamente para el estudio de comunidades microbianas es su sensibilidad, reproducibilidad y la capacidad de responder diferencialmente a diferentes sistemas de labranza (Govaerts *et al.*, 2007), suelos contaminados (Boivin *et al.*, 2002), rizosfera (Soderberg *et al.*, 2004) y diferentes prácticas de manejo del suelo (Mäder *et al.*, 2002).

El sistema Biolog es un sistema redox y dependiente del cultivo de microorganismos que consiste en una microplaca de 96 pocillos con diferentes sustratos carbonados y un indicador redox incoloro en cada uno de ellos. El desarrollo del color se mide espectrofotométricamente (absorbancia). A pesar de su extendida utilización, el método posee varios inconvenientes que han desalentado su uso y el reemplazo por otros métodos como los biosensores de oxígeno que se presentan a continuación. La principal desventaja radica en el hecho de que es dependiente de cultivo, pueden ocurrir cambios en la comunidad microbiana durante la incubación debido al enriquecimiento selectivo (Smalla *et al.*, 1998) y la contribución de los hongos a la respiración de la comunidad no es incluida debido a su lento crecimiento (Nannipieri *et al.*, 2003).

Un sistema más reciente que permite superar estas dificultades es el desarrollado por Wodnicka *et al.* (2000), ampliamente utilizado a lo largo de esta Tesis y en diversos estudios de ecología microbiana para la obtención de perfiles fisiológicos. Este sistema no depende de un indicador redox sino que consiste en la utilización de microplacas de 96 pocillos que contienen un fluoróforo sensible al oxígeno, de modo tal de monitorear el oxígeno consumido durante la respiración mediante mediciones de fluorescencia. El sistema comercializado por BD Biosciences (Bedford, MA, USA), conocido como BD Oxygen

INTRODUCCIÓN GENERAL

Biosensor System (BDOBS), posee un fluoróforo sensible al oxígeno, cloruro de 4,7-difenil-1,10-fenantrolina rutenio (II), absorbido en una matriz siliconada permeable al oxígeno presente en la parte inferior del pocillo. La fluorescencia de este compuesto es extinguida por la presencia de oxígeno y en consecuencia se incrementa a medida que la respiración microbiana en la suspensión de suelo consume el oxígeno disponible. Dado que la matriz con el fluoróforo es el único componente de las placas, ciertos factores como la disponibilidad de nutrientes o factores fisicoquímicos pueden ser manipulados en el ensayo. Al mismo tiempo, dado que dicha matriz se encuentra ubicada en la parte inferior y la medición se basa en fluorescencia (no en absorbancia), es posible evaluar materiales turbios u opacos con equipos de lectura desde la parte inferior de la microplaca. Mediante este sistema de medición, Garland *et al.* (2003) reportaron la utilización de concentraciones muy bajas de sustrato ($50\text{-}100\text{ mg l}^{-1}$) que representan valores entre 10-100 veces menores a los requeridos en CLPP con el sistema Biolog. Asimismo, Garland *et al.* (2003) encontraron que la cinética de la respuesta fluorescente se correlaciona con medidas *in situ* de uso de los sustratos, indicando que la metodología BDOBS-CLPP produce perfiles funcionalmente relevantes a diferencia de Biolog-CLPP. El requerimiento de cantidades de sustratos entre 10-100 veces menor que en otras metodologías de CLPP permite superar las dificultades relacionadas con el enriquecimiento selectivo. La cuantificación del oxígeno consumido permite una mayor sensibilidad (utilización de menores concentraciones de sustrato) debido a que es casi 30 veces menos soluble que el dióxido de carbono (Bugbee *et al.*, 2008; Zabaloy *et al.*, 2008). Asimismo, la medición de la respiración basada en el consumo de oxígeno no se ve afectada por factores que influyen sobre la evolución del dióxido de carbono. El flujo de dióxido de carbono en la superficie del suelo es una medida indirecta de respiración que supone que todo el flujo es resultado de la respiración, lo cual es válido sólo en un corto período de tiempo. Existen múltiples factores que podrían contribuir significativamente al flujo de dióxido de carbono en la superficie del suelo y que deben ser considerados para estimar adecuadamente las tasas de respiración. La concentración de dióxido de carbono en los gases del suelo y el flujo a la superficie varían con la temperatura, el contenido de agua y el pH dado que estas variables fisicoquímicas influyen en su solubilidad y en su equilibrio con carbonatos (Bugbee, 2008).

El sistema BDOBS ha sido estudiado y optimizado por Zabaloy *et al.* (2008a). De acuerdo con los resultados de esta investigación, la utilización de volúmenes cercanos a la capacidad máxima del pocillo permiten discernir tanto la respuesta a una concentración de sustrato tan baja como 10 mg l^{-1} , como también la respiración endógena (sin sustrato). Se ha sugerido incluso que no es necesario el sellado de la placa como barrera al oxígeno

cuando se utilizan volúmenes grandes en los pocillos. También se determinó que la disrupción de las muestras mediante preparación de suspensiones de suelo no tiene efectos en la respuesta fluorescente global cuando se compara con la utilización de muestras encerradas en microbolsas. Diversos trabajos han demostrado la aplicabilidad y las ventajas de utilización de placas BDOBS en mediciones de respiración de comunidades microbianas del suelo (Garland *et al.*, 2003; Zabaloy *et al.*, 2008; Zabaloy *et al.*, 2012).

4.4 Perfiles basados en ADN

Existen diferentes métodos para la obtención de perfiles basados en ADN, entre los más utilizados se encuentran el polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción terminales (T-RFLP, Liu *et al.*, 1997) y la electroforesis en gel con gradiente de desnaturizante (DGGE, Muyzer *et al.*, 1993) o de temperatura (TGGE, Heuer y Smalla, 1997). En todos los casos, se requiere de una etapa inicial de amplificación de un fragmento del gen de interés por PCR, a partir del cual se obtendrán los perfiles. Este fragmento presentará pequeñas diferencias en su secuencia entre diferentes grupos microbianos y por lo tanto, el producto de PCR obtenido de ADN de la muestra ambiental consistirá en una mezcla de productos del mismo gen con tamaños iguales o muy similares pero con diferente secuencia. Esas diferencias en la secuencia permiten obtener un perfil o patrón de bandas que reflejan la estructura de la comunidad en una determinada muestra y que constituyen su “*fingerprinting*” genético. A continuación se hará referencia únicamente a DGGE dado que constituye la metodología más ampliamente utilizada en estudios de ecología microbiana y es la que se utilizó en este trabajo de Tesis.

Mediante DGGE los fragmentos (similares en tamaño) no se separan en base al tamaño de los mismos sino en base a sus diferencias en secuencia, lo cual es posible a través de la construcción de un gradiente de desnaturizante en el gel. Una variante, conocida como TGGE, hace uso de un gradiente de temperatura para lograr la separación. La metodología DGGE es especialmente adecuada para una comparación rápida y simultánea de múltiples muestras bajo estudio. Desde su introducción en el campo de la ecología microbiana por Muyzer *et al.* (1993), ha sido adaptada en muchos laboratorios como una herramienta conveniente para la evaluación de la estructura de la comunidad microbiana en muestras naturales. Debe tenerse en cuenta que la fracción de la comunidad a estudiar va a depender de los cebadores utilizados en la PCR. Uno de los genes más utilizados en bacterias para la obtención de perfiles de las comunidades es el que codifica para el ARNr 16S. Existen alrededor de 14 regiones de este gen que han sido utilizadas para generar *fingerprintings* de comunidades bacterianas. De acuerdo con Gomes *et al.* (2001), es posible distinguir

diferentes grupos filogenéticos de bacterias (*Actinomicetales*, *α -proteobacteria*, *β -proteobacteria*, *Eubacteria*) con diferentes cebadores. Grupos microbianos específicos como bacterias y arqueas oxidantes del amoníaco también han sido evaluados mediante esta metodología (Hernández *et al.*, 2010; Zabaloy *et al.*, 2016b).

4.5 Cuantificación de genes específicos para distintos grupos microbianos

En los últimos 10 años, la PCR-cuantitativa (qPCR, también conocida como *Real-Time PCR*) se ha consolidado como una metodología de referencia en el campo de la ecología microbiana para el estudio de comunidades, con aplicaciones promisorias y cada vez más extendidas. La qPCR consiste en la detección en tiempo real de una molécula reportera cuya fluorescencia se incrementa a medida que el producto de PCR se acumula durante cada ciclo de amplificación. Una característica que distingue a la qPCR respecto de otros métodos de análisis de comunidades microbianas es su capacidad de evaluar de manera rápida y con una alta sensibilidad la abundancia de grupos filogenéticos específicos (Fierer *et al.*, 2005). Numerosos estudios han demostrado la capacidad de la qPCR de proporcionar información cuantitativa y ecológicamente relevante en diferentes tipos de muestras ambientales, entre ellas, en muestras de ADN de suelo. No sólo ha sido aplicada exitosamente en la cuantificación de diferentes grupos microbianos (Okano *et al.*, 2004; Fierer *et al.*, 2005; Pfeiffer *et al.*, 2014) sino que más recientemente también ha sido utilizada para la cuantificación de elementos de fundamental importancia en las comunidades microbianas como son los elementos genéticos móviles (EGMs), especialmente plásmidos de amplio rango de hospedador (Jechalke *et al.*, 2013) e integrones (Barraud *et al.*, 2010), introducidos en la siguiente sección.

4.6 Grupos microbianos de relevancia ecológica

En esta Tesis se consideraron especialmente dos grupos de microorganismos frente a tratamientos con el herbicida glifosato, tanto en suelo rizosférico (Capítulo 4) como no rizosférico (Capítulos 2 y 3): *Actinobacteria* y los microorganismos oxidantes del amoníaco (MOA). En el primer caso, los análisis realizados fueron sólo a nivel de abundancia. En el segundo caso, se estudió la abundancia de bacterias y de arqueas oxidantes del amoníaco (BOA y AOA, respectivamente) como así también la estructura de la comunidad de BOA (PCR-DGGE).

Diversos aspectos, mencionados a continuación, justifican la consideración de estos dos grupos microbianos como posibles indicadores del impacto de glifosato.

4.6.1 Microorganismos oxidantes del amoníaco (MOA)

El ciclo del nitrógeno (N) tiene una importancia fundamental en la productividad de ecosistemas naturales y agrícolas. La nitrificación y la desnitrificación son las dos principales transformaciones del N en el suelo. La nitrificación es el proceso de oxidación autotrófica del amonio a nitrito y luego a nitrato. En particular, la regulación de la nitrificación es considerada el paso clave para un eficiente ciclado del N, ya que en contraste con otros pasos del ciclo del N, sólo un número limitado de microorganismos es capaz de convertir el amonio en nitrato. El paso limitante en la nitrificación es la oxidación de amonio a nitrito, el cual se oxida rápidamente a nitrato por los microorganismos oxidantes del nitrito (Kowalchuk y Stephen, 2001). La oxidación de amonio en los suelos es mediada por la actividad de bacterias y arqueas oxidantes del amonio (BOA y, AOA, respectivamente; Prosser y Nicol, 2012). Aunque se conocen algunas pocas especies de bacterias heterótrofas nitrificadoras, la vasta mayoría son procariotas aerobios quimiolitotróficos que tienen la capacidad de usar amonio como única fuente de energía y dióxido de carbono como fuente de carbono (C) (Kowalchuk y Stephen, 2001). En las BOA y AOA, el amonio primero es oxidado por la enzima de membrana amonio-monooxigenasa. Los genes que codifican para esta enzima forman parte del operón *amoCAB*. En particular, el gen *amoA* ha sido extensamente estudiado como biomarcador para estudiar la diversidad de las BOA (Kowalchuk y Stephen, 2001; Junier *et al.*, 2010). Se ha postulado a los cambios en el número de MOA y en la composición de especies como indicadores *in situ* del impacto biológico de contaminantes y como indicadores finales (*endpoints*) en la recuperación de ambientes contaminados (Kowalchuk y Stephen, 2001), ya que son especialmente sensibles a metales pesados (Zn; Mertens *et al.*, 2006), herbicidas (Hendricks y Rhodes, 1992; Hernández *et al.*, 2011; Feld *et al.*, 2015), fungicidas (Puglisi *et al.*, 2012) e hidrocarburos (Deni y Penninckx, 1999).

Las pérdidas de nitrógeno producidas por procesos de nitrificación rápidos y desregulados constituyen un problema de gran relevancia ambiental. Esto es particularmente preocupante para los suelos que se encuentran bajo los sistemas de intensificación agrícola modernos donde cerca de un 95% del nitrógeno total circula a través de la vía de nitrificación-denitrificación. Como consecuencia de ello, los suelos se caracterizan por una baja recuperación de N y de eficiencia de uso del mismo (Subbarao *et al.*, 2015). Conocer los factores que afectan el proceso de nitrificación en estos sistemas y que impactan sobre los grupos microbianos involucrados en él es fundamental tanto por su importancia en la bioquímica del suelo como por la sensibilidad de los MOA como indicadores frente a pesticidas. En este sentido, el estudio de los efectos del glifosato en comunidades microbianas nitrificantes del suelo debe comenzar a estudiarse en mayor

profundidad. El primer reporte sobre el tema tuvo lugar recientemente (Zabaloy *et al.*, 2016b), hasta el momento los MOA no habían sido considerados como un blanco de estudio frente a glifosato pese a que otros pesticidas habían mostrado efectos significativos (Hernández *et al.*, 2011, Feld *et al.*, 2015).

Los estudios de impacto de glifosato llevados a cabo a partir del Capítulo 2 de esta Tesis incluyen a las BOA y AOA dentro de los grupos seleccionados como indicadores microbiológicos.

4.6.2 *Actinobacteria*

El filo *Actinobacteria* es uno de los filo bacterianos dominantes en diversos nichos ecológicos como los encontrados en ambientes acuáticos y terrestres, comprendiendo diversos géneros de bacterias gram positivas como así también gram-variables. Sus miembros se caracterizan por un complejo ciclo de vida que puede incluir tanto esporas en dormición como así también formas filamentosas de crecimiento activo. Constituye un filo de gran relevancia ecológica, predominante de la microbiota del suelo, donde lleva a cabo importantes funciones para su fertilidad a través de la degradación de la materia orgánica y formación de humus, desempeñando un papel central en diversos procesos biológicos como los ciclos biogeoquímicos, la promoción del crecimiento vegetal y la biorremediación (ElTarabily y Sivasithamparam, 2006; Anandan *et al.*, 2016;). Debido a esta amplia distribución en ambientes terrestres respecto de otros filo y a su múltiples roles ecológicos, la inclusión de este grupo microbiano es de especial importancia en el análisis de impacto frente a pesticidas. No obstante, además de los mencionados roles, una de las razones principales que justifica el análisis de este grupo microbiano se basa en la reconocida capacidad de *Actinobacteria* de producir y secretar una amplia gama de metabolitos y enzimas que tienen el potencial de influenciar notablemente a otros miembros de las comunidades microbianas. Son antagonistas de diversos microorganismos a través de la producción de diversos metabolitos secundarios (Karlovsy, 2008) y/o la secreción de enzimas que inhiben el crecimiento (Suneetha y Zaved, 2011). Así, por ejemplo, en suelos con una alta densidad poblacional de actinobacterias se ha observado inhibición del crecimiento de rizobacterias afectando negativamente la nodulación (Pereira *et al.*, 1999). Por lo tanto, un incremento o disminución de la abundancia *Actinobacteria* frente a tratamientos con glifosato podría repercutir indirectamente en la estructura de las comunidades microbianas.

Como se mencionará en la próxima sección, los antibióticos podrían tener diversas funciones a las concentraciones sub-inhedoras a las que normalmente se encuentran en el

suelo, entre ellas la señalización y la modulación. Dado que las actinobacterias son prolíficas productoras de diversos tipos de antibióticos, la modificación en su abundancia dentro de las comunidades podría derivar en diversas modificaciones estructurales y funcionales. Asimismo, en relación con el modo de acción del glifosato (véase Sección 1.2), el glifosato inhibe una enzima clave en la síntesis de aminoácidos aromáticos que está presente tanto en plantas como en bacterias. Se cree que el modo de acción no sólo estaría relacionado con la imposibilidad de síntesis de dichos aminoácidos sino también con el secuestro de C necesario para otras vías biosintéticas (Duke y Powles, 2008). La consideración de ambos efectos bioquímicos permite pensar que el glifosato podría afectar no sólo la síntesis de aminoácidos aromáticos sino también la biosíntesis de compuestos importantes que derivan de ellos, como por ejemplo, ciertos antibióticos naturales. El trans-cinamato, por ejemplo, proviene de la desaminación de la fenilalanina y es un precursor de ciertos antibióticos naturales a través de reacciones catalizadas por policétido sintasas (PKSs) de tipo II.

4.7 Elementos genéticos móviles (EGMs)

La transferencia horizontal de genes (THG) es un fenómeno ampliamente observado en bacterias que se refiere al intercambio de información genética entre poblaciones relacionadas o filogenéticamente distintas de una comunidad. Es un fenómeno que ocurre extensamente entre procariotas, especialmente en respuesta a ambientes cambiantes dado que provee a los microorganismos de genes adicionales que otorgan capacidad de adaptación frente a dichos cambios. La THG es reconocida como la principal fuerza impulsora de la diversificación y adaptación bacteriana (Iwasaki y Takagi, 2009). Como se mencionó anteriormente, la THG es una de las características más importantes que contribuyen a la adaptación evolutiva a nivel poblacional en procariotas y que por lo tanto contribuye en gran medida a la resistencia y resiliencia de las comunidades microbianas (Shade *et al.*, 2012). Es mediada por diferentes procesos como la transformación natural, la transducción o la conjugación. Esta última es considerada esencial para una respuesta relativamente rápida a condiciones ambientales cambiantes (Heuer y Smalla, 2012).

Los elementos genéticos móviles (EGMs) consisten en segmentos de ADN que pueden moverse ya sea desde una localización genética a otra en la misma célula, o desde una célula bacteriana a otra relacionada o filogenéticamente distinta (Bennett, 2008). Los EGMs son altamente heterogéneos: desde secuencias de inserción (SI) simples que contienen sólo la información requerida para cambiar su localización desde una parte del genoma a otra, hasta plásmidos autotransferibles más complejos con genes que le permiten transferirse y

mantenerse por sí mismos en bacterias filogenéticamente muy distintas (Heuer y Smalla, 2012). La adquisición de EGMs permite a las bacterias obtener una considerable variedad de genes adicionales no esenciales que codifican para diferentes caracteres beneficiosos, incluyendo los que confieren resistencia a antibióticos o metales pesados, degradación de xenobióticos y determinantes de virulencia. Los productos de estos genes pueden ser beneficiosos (por ejemplo, aquellas enzimas que participan en la degradación de xenobióticos) pero también pueden resultar perjudiciales para otras células bacterianas próximas. Más aún, muchos EGMs portan genes de resistencia a antibióticos, una característica que no sólo otorgaría una ventaja competitiva a ciertas especies respecto de otras, sino que sería de gran importancia para las comunidades microbianas dado el rol modulador de la expresión génica y de comunicación intercelular que recientemente se les ha atribuido a los antibióticos en ambientes naturales (Davies *et al.*, 2006; Aminov *et al.*, 2009; Heuer y Smalla, 2012). Esta señalización mediada por las concentraciones sub-inhedoras a las que normalmente se observan los antibióticos en ambientes naturales, sería determinante para las respuestas adaptativas fenotípicas y genotípicas de la microbiota y de otros miembros de la comunidad de microorganismos del suelo. La ampliación del rol de los antibióticos y de la resistencia a los mismos en la naturaleza sugiere, desde una perspectiva evolutiva y ecológica, que los antibióticos habrían evolucionado como una forma de comunicación dentro y entre dominios biológicos en diferentes ecosistemas (Aminov *et al.*, 2009).

De esta manera, queda en evidencia la importancia que tienen los EGMs para la estructura y el funcionamiento de las comunidades microbianas, y la importancia de incorporar a la evaluación de los EGMs como indicadores ecológicamente relevantes para el estudio de comunidades microbianas. Si bien existen varios indicadores microbiológicos que han sido tradicionalmente utilizados frente a diversos pesticidas, la utilización de EGMs como indicadores del impacto de pesticidas ha sido comparativamente menos frecuente (Anjum *et al.*, 2011; Dunon *et al.*, 2013; Dealtry *et al.*, 2014). En el caso de glifosato, no existen reportes de la utilización de EGM como indicadores en comunidades microbianas. La evaluación de los mismos podría devenir en una herramienta útil para determinar si las prácticas agrícolas que implican el uso de glifosato suponen potenciales riesgos respecto de prácticas que no dependen del mismo.

4.7.1 Plásmidos IncP-1

Los plásmidos IncP-1 se encuentran dentro de los plásmidos de amplio rango de hospedador (BHR) autotransmisibles más promiscuos que existen en *Proteobacteria*.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Muchos de ellos portan genes accesorios beneficiosos para el hospedador incluyendo aquellos que confieren resistencia a múltiples antibióticos y metales pesados, codifican factores de virulencia o están involucrados en la degradación de diversos compuestos xenobióticos (Adamczyk y Jagura-Burdzy, 2003). De hecho, entre los plásmidos catabólicos con genes degradadores, los pertenecientes al grupo IncP-1 son de particular interés dado que poseen un amplio rango de hospedador y se transfieren eficientemente en un ambiente como es el suelo y en especial la rizosfera. En la actualidad, el número de plásmidos catabólicos completamente secuenciados que pertenecen al grupo IncP-1 está experimentando un rápido crecimiento. Se han identificado varios plásmidos IncP-1 que portan genes para la degradación de pesticidas como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Top *et al.*, 1995; Trefault *et al.*, 2004; Vedler *et al.*, 2004) atrazina (Martínez *et al.*, 2001) y cloroanilina (Król *et al.*, 2012) y diversos compuestos aromáticos clorados (Sen *et al.*, 2011), resaltando el importante rol de estos plásmidos en la remoción de pesticidas del ambiente.

El rango de hospedador de estos plásmidos sería más amplio que el que se suponía originalmente. En condiciones que permiten un contacto celular adecuado, los plásmidos IncP-1 tienen la capacidad de transferirse y ser alojados en hospedadores pertenecientes a múltiples fila bacterianos. En un estudio reciente, se determinó el rango de hospedador de tres plásmidos BHR incluyendo dos pertenecientes al grupo IncP-1: pKJK5 (IncP-1 ϵ) y RP4 (IncP-1 α). Los resultados indicaron que estos plásmidos son capaces de transferirse a las 5 clases de Proteobacteria (α - ϵ) junto a otros 10 fila diferentes a *Proteobacteria*, incluyendo *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes* y *Actinobacteria* (Klümper *et al.*, 2015).

Otro aspecto muy importante de los plásmidos IncP-1 es su notable distribución en diferentes tipos de ambientes. A pesar de que se obtuvieron originalmente de aislamientos clínicos (Jacoby *et al.*, 1976), han podido ser detectados en diferentes muestras ambientales como las provenientes de lodos, sedimentos marinos, enmiendas de animales, biofiltros, rizosfera, suelos agrícolas, plantas de tratamientos de efluentes y arroyos (Top *et al.*, 1995; Dahlberg *et al.*, 1997; Smalla *et al.*, 2006; Bahl *et al.*, 2009; Sen *et al.*, 2011; Heuer y Smalla, 2012). Diferentes estudios han reportado un enriquecimiento en plásmidos IncP-1 frente a la exposición a pesticidas utilizando metodologías como qPCR y el número de copias del gen *korB* de plásmidos IncP-1 como indicador (de todos los subgrupos conocidos), gen que codifica para una proteína esencial en el sistema de partición y regulación del plásmido (Jechalke *et al.*, 2013). Recientemente, por ejemplo, la pirosecuenciación de amplicones del gen *trfA* (que codifica para la proteína de inicio de la replicación) en muestras de biofiltros agrícolas (BPS) reveló una alta diversidad de plásmidos IncP-1 y un incremento en la

abundancia de plásmidos IncP-1 β a lo largo de un período de tres meses en los que las concentraciones de múltiples pesticidas se incrementaron concomitantemente (Dealtry *et al.*, 2014). La metodología PCR-Southern blot, altamente sensible y específica, ha sido utilizada también en el mencionado estudio y en otros para la detección de plásmidos IncP-1 de subgrupos específicos en muestras ambientales (Heuer y Smalla, 2012; Dealtry *et al.*, 2014).

4.7.2 Integrones de clase I

Los integrones de clase I son un tipo de EGMs que se caracterizan por la presencia de tres componentes centrales: un gen que codifica para una integrón-integrasa (*intI1*), un sitio de recombinación (*attI*) y un promotor (P_c). Estas características le permiten capturar y expresar genes exógenos como parte de casetes que se insertan por recombinación en el sitio *attI* mediante la actividad de la enzima integrasa codificada por *intI1*. Los integrones son capaces de coleccionar casetes génicos de un *pool* muy diverso, incluyendo resistencias múltiples a antibióticos. A diferencia de ciertos plásmidos IncP-1, como los IncP-1 β , que se caracterizan por la presencia de genes catabólicos involucrados en la degradación de pesticidas, los integrones de clase I no suelen estar asociados a la resistencia a contaminantes. Sin embargo, pueden considerarse indicadores indirectos de impacto de pesticidas teniendo en cuenta que están asociados a una gran diversidad de genes de resistencia a antibióticos. Dado que la resistencia a antibióticos en comunidades microbianas implica una ventaja competitiva para las células que portan los genes accesorios responsables, las modificaciones en la abundancia de integrones de clase I frente a ciertos contaminantes podrían asociarse entonces a modificaciones en las comunidades microbianas. De esta manera, la abundancia del gen *intI1* podría constituir un indicador de presiones de selección en la comunidad. Por otro lado, un incremento en la abundancia de integrones de clase I podría tener implicancias importantes a nivel de salud humana y animal dada su notable capacidad de transferir horizontalmente genes de resistencia, eventualmente hacia patógenos humanos naturalmente presentes en el suelo (Gillings *et al.*, 2014). Esto permite considerarlos como indicadores de relevancia ecológica y sanitaria e incluir las modificaciones en la abundancia del gen *intI1* frente a diferentes prácticas agronómicas en evaluaciones de impacto ambiental.

5. Estado del arte sobre el impacto de glifosato en comunidades microbianas del suelo

En las secciones anteriores se introdujeron conceptos teóricos importantes acerca de las respuestas de las comunidades microbianas a los disturbios/estreses y de la importancia de utilizar indicadores que permitan determinar el estado de las comunidades microbianas en

diferentes condiciones, teniendo en cuenta el rol fundamental de los microorganismos en los procesos bioquímicos que ocurren en el suelo. La introducción de estos conceptos es fundamental para abordar el impacto de ciertas prácticas agronómicas sobre la microbiota del suelo, teniendo en cuenta que estas prácticas implican en muchos casos una situación de estrés o disturbio para las comunidades microbianas.

En esta sección se mencionarán, en particular, algunos de los estudios más importantes sobre el impacto de glifosato en comunidades microbianas del suelo, ampliamente citados en la literatura, que resumen una parte importante del conocimiento actual sobre el tema.

5.1 Estudios en suelo no rizosférico

Los estudios sobre el impacto de glifosato en el suelo han sido numerosos y diversos. Una de las primeras investigaciones acerca del impacto de glifosato en microorganismos del suelo, alrededor de 40 años atrás, indicó efectos mínimos sobre la microbiota y ausencia de movilidad por lixiviación (Rueppel, 1977). Sin embargo, estos efectos aparentemente menores, fueron puestos en discusión por estudios posteriores que indicaron que las respuestas fisiológicas de microorganismos del suelo pueden ser altamente variables (Fischer *et al.*, 1986; Quinn, 1988), y que existían diferentes niveles de sensibilidad de la enzima EPSPS (Schulz *et al.*, 1985). De hecho, si bien actualmente se conoce que existen tres tipos de EPSPS en función de la tolerancia a glifosato, el rango completo de sensibilidad a glifosato en comunidades microbianas no se ha determinado completamente (Duke *et al.*, 2012).

En el año 1985 se publicó una de las primeras revisiones sobre los efectos en la microflora (Grossbard, 1985). Quinn *et al.* (1988) indicaron que, en general, la mayoría de los estudios considerados en dicha revisión, que reportaban inhibiciones severas, carecían de relevancia ecológica dado que se basaban en experimentos *in vitro* con cultivos puros. Desde entonces, y hasta la fecha, los estudios han sido cada vez más numerosos y variados en cuanto al enfoque específico de cada uno de ellos, el diseño particular y la tendencia de los resultados obtenidos. Muchos de los resultados de estos estudios, algunos de ellos altamente contrastantes, han sido muy bien compilados y discutidos en uno de las revisiones más completas sobre impacto de glifosato en suelos publicadas hasta la fecha (Duke *et al.*, 2012). En el año 2000, una revisión sobre estudios ecotoxicológicos del formulado Roundup® indicó un riesgo mínimo frente exposiciones crónicas o agudas para organismos terrestres no blanco debido a la fuerte adsorción y rápida degradación del glifosato en el suelo (Giesy *et al.*, 2000). Años antes, se publicaron las conclusiones de tres grandes organizaciones (*Agriculture Canada, United States Environmental Protection*

INTRODUCCIÓN GENERAL

Agency y *World Health Organization*) indicando que el formulado Roundup® podía ser utilizado con mínimos riesgos para el ambiente (Giesy *et al.*, 2000). En el año 2001, uno de los estudios de mayor duración (9-13 años) y que incluyó diversos suelos forestales de diferente capacidad de adsorción de glifosato y diferente potencial de crecimiento, reconoció nuevamente el limitado alcance en cuanto a predicción de toxicidad de aquellos experimentos basados en medios de cultivo artificiales inoculados con glifosato (Busse *et al.*, 2001). Los resultados de dicho estudio sugirieron, además, ausencia de efectos o bien efectos mínimos del formulado Roundup®, en las dosis recomendadas a campo, sobre comunidades microbianas expuestas crónicamente al herbicida. Posteriormente, diferentes autores coincidieron en la ausencia de efectos o en efectos temporales de corta duración, principalmente sobre ciertos parámetros integradores que tienen en cuenta a toda la comunidad (no a grupos específicos dentro de ella) cuando se aplica el glifosato en las dosis recomendadas (Busse *et al.*, 2001; Ratcliff *et al.*, 2006; Zabaloy y Gómez, 2008; Gómez *et al.*, 2009), aunque también se han observado efectos transitorios al evaluar grupos específicos (Nye *et al.*, 2014).

Es importante destacar que los efectos del glifosato en los microorganismos del suelo han sido investigados en base a diferentes parámetros biológicos y empleando diferentes metodologías. Actualmente, a partir del gran número de estudios realizados durante más de 40 años, resulta difícil establecer generalizaciones basadas en las conclusiones generales de cada uno de ellos. Esto se debe a las características particulares de cada experimento, entre ellas, tipo de muestras (suelo rizosférico o no rizosférico), métodos utilizados (integradores o para grupos específicos de microorganismos), dosis utilizadas (recomendadas a campo o superiores), estudios a campo o en microcosmos, utilización de IA o de FC de glifosato, aplicaciones únicas o repetidas del herbicida, tipo de suelo, etc. Diferentes autores han reconocido esta dificultad (Newman *et al.*, 2016a; Nguyen Binh *et al.*, 2016). En muchos casos, como se mencionó anteriormente, se ha reconocido la presencia de efectos mínimos o ausencia de efectos en las dosis recomendadas a campo, utilizando indicadores integradores de poca capacidad resolutive. Entre estos indicadores se encuentran, por ejemplo, respiración, biomasa microbiana, recuento de bacterias totales, etc. Más allá de estas coincidencias, también existen resultados inconsistentes, debidos posiblemente a las diferencias entre experimentos mencionadas anteriormente. Un metanálisis indicó que los efectos del glifosato en la biomasa microbiana y en la respiración son altamente variables y dependientes de la concentración, duración de la exposición y carbono orgánico del suelo (Nguyen Binh *et al.*, 2016). En ese estudio se concluyó que la toxicidad o inocuidad del glifosato para las comunidades microbianas del suelo necesita ser

INTRODUCCIÓN GENERAL

definida bajo condiciones específicas del suelo, reconociendo la necesidad de explorar con mayor profundidad el impacto de glifosato por medio de métodos moleculares (Nguyen Binh *et al.*, 2016). Al mismo tiempo, diversos estudios indican que las generalizaciones postuladas inicialmente respecto de la inocuidad del glifosato en el suelo debido a su fuerte adsorción y la baja movilidad deben ser consideradas en función de cada tipo de suelo. Esto se debe a que la capacidad adsorción y el desplazamiento del glifosato por parte de fosfatos son diferentes en cada tipo de suelo (Gimsing y Borggaard, 2002). De hecho, existen estudios que indican que tanto el glifosato como su producto de degradación, el AMPA, han sido detectados en el agua del suelo y que el riesgo de desorción es mayor en suelos con fertilización fosforada (Fomsgaard *et al.*, 2003; Simonsen *et al.*, 2008). Asimismo, la biodisponibilidad de glifosato y su metabolización en el suelo también es evidenciada en estudios que demuestran un incremento de actividad y la biomasa microbiana (Wardle y Parkinson, 1990; Haney *et al.*, 2000).

Los resultados de numerosos estudios indican, recurrentemente, que el glifosato no tendría efectos o sólo efectos menores y de corta duración cuando se evalúan aplicaciones únicas (Ratcliff *et al.*, 2006; Zabaloy y Gómez, 2008; Gómez *et al.*, 2009; Zabaloy *et al.*, 2012; Zabaloy *et al.*, 2016a) o sólo dos aplicaciones (Weaver *et al.*, 2007). En muchos casos, estos resultados se observan empleando parámetros integrativos o de amplio rango basados en respuestas de toda la comunidad como respiración y biomasa microbiana (Haney *et al.*, 2000; Zabaloy y Gómez, 2008; Gómez *et al.*, 2009) pero también se observa ausencia de efectos o efectos de corta duración en parámetros que dan información a nivel de sub-comunidad como PFLA (Weaver *et al.*, 2007), T-RFLP (Zabaloy *et al.*, 2012) y PCR-DGGE (Zabaloy *et al.*, 2016a). De manera similar, las aplicaciones repetidas anualmente durante un período prolongado (mayor a 10 años) no mostraron efectos sobre parámetros de amplio rango como mineralización de N, biomasa microbiana y respiración microbiana (Hart y Brookes, 1996) o sobre bacterias totales, qCO_2 y respiración basal (Busse *et al.*, 2001).

A pesar de la tendencia mencionada anteriormente, existen evidencias que sugieren posibles efectos colaterales graduales en el largo plazo. Zabaloy *et al.* (2012) evaluaron el efecto de la exposición crónica a glifosato a campo (más de 11 años) empleando microcosmos preparados a partir de dos suelos agrícolas de la Región Pampeana con larga historia de glifosato. Se prepararon microcosmos con los suelos, y se les adicionó glifosato en dosis de 0, 15 y 150 mg kg⁻¹. Un suelo de pastura natural se usó como referencia. El glifosato aumentó la respiración en el suelo de pastura natural, posiblemente debido a una respuesta de estrés de las bacterias sensibles al glifosato, mientras que en los suelos

agrícolas, la respiración disminuyó, probablemente por la selección previa de microorganismos aclimatados para la asimilación rápida de sustratos derivados de la degradación cometabólica del herbicida. La abundancia de bacterias aumentó en respuesta a la dosis alta de glifosato en uno de los suelos, pero no se observó enriquecimiento selectivo de grupos bacterianos (no se detectaron OTUs dominantes en el análisis de T-RFLP en los microcosmos tratados). La hipótesis que surgió de este trabajo es que el glifosato no ejercería una toxicidad directa, sino que tendría un efecto gradual causando cambios relativos en la estructura de la comunidad, al reducir paulatinamente la abundancia de especies sensibles que gastan más energía en la respuesta al estrés (exposición a glifosato) y estimulando las poblaciones de bacterias adaptadas a la utilización rápida de los nutrientes liberados del metabolismo de la molécula.

En concordancia con esta última investigación, los estudios de aplicaciones repetidas basados en indicadores de estructura de la comunidad como PFLA y secuenciación del gen del ARNr 16S indican que existen grupos específicos de microorganismos que pueden verse notablemente afectados (Lancaster *et al.*, 2009), aun cuando otros trabajos reportan ausencia de cambios con métodos integrativos o de amplio rango (Busse *et al.*, 2001). Los estudios de aplicaciones repetidas del formulado comercial en microcosmos realizados por Lancaster *et al.* (2009) indicaron un incremento en la abundancia de *Burkholderia* spp. luego de cinco aplicaciones en relación al control, al igual que un incremento en el contenido de ácidos grasos fosfolipídicos correspondientes a bacterias gram negativas.

5.2 Estudios en suelo rizosférico

Contrariamente a la ausencia de efectos o a efectos de corta duración observados en suelo no rizosférico (*bulk soil*) (mencionados en la sección anterior), muchos resultados de estudios en suelo rizosférico indican un impacto sobre grupos microbianos específicos. Recientemente, mediante estudios metagenómicos (secuenciación de amplicones del ARNr 16S), se observaron modificaciones en la rizosfera tanto de cultivos de soja como de maíz al ser tratados con un formulado comercial a nivel de invernáculo. Si bien la diversidad de la comunidad bacteriana globalmente no mostró diferencias significativas entre muestras con y sin glifosato (tanto diversidad α como β), la abundancia de ciertos grupos bacterianos se modificó en respuesta al herbicida. La abundancia relativa de secuencias correspondientes a *Proteobacteria* se incrementó un 3% en maíz y un 1,8% en soja. Aunque todas las clases de *Proteobacteria* se incrementaron, *Gammaproteobacteria* mostró el mayor incremento. Contrariamente, se detectó una disminución en la abundancia relativa del filo *Acidobacteria*. Dado que los miembros de este grupo desempeñan funciones importantes en los procesos

biogeoquímicos, se concluyó que dicha disminución podría conducir a cambios significativos en el estado nutricional de la rizosfera (Newman *et al.*, 2016a). De hecho, el incremento de la colonización de raíces por patógenos fúngicos en soja GR tratada con glifosato ha sido atribuido, en parte, a modificaciones del estatus nutricional de la rizosfera (Kremer y Means, 2009). De manera similar, Zobiole *et al.* (2010) reportaron importantes cambios en la rizosfera de soja resistente a glifosato de cultivares de primera (GR1) y segunda (GR2) generación tratados con un formulado comercial. Se observó un incremento en la colonización de raíces por parte de *Fusarium* spp. en forma proporcional a la dosis de glifosato, en ambos cultivares. Contrariamente, la abundancia de *Pseudomonas* spp. y de bacterias productoras de ácido indolacético (IAA) se redujo al igual que la relación de bacterias reductoras de Mn respecto de las oxidantes.

5.3 Perspectivas futuras sobre estudios de impacto de glifosato en comunidades microbianas del suelo

Como se deduce del vasto número de trabajos mencionados en la sección anterior, el impacto de glifosato en microorganismos del suelo constituye un área que ha sido extensamente estudiada durante 40 años debido al creciente interés en conocer los posibles efectos no deseados en un recurso de fundamental importancia para los agroecosistemas como es el suelo. No obstante, ciertos aspectos de relevancia agronómica han sido escasa y llamativamente poco estudiados.

Uno de ellos se encuentra relacionado con la respuesta de tolerancia de la comunidad inducida por el contaminante (PICT), concepto introducido en la Sección 3.5. La respuesta PICT se ha estudiado y verificado en comunidades microbianas del suelo frente a diversos contaminantes, pero en el caso de glifosato no existen reportes al respecto. El Capítulo 1 de esta Tesis se ocupará de este interrogante.

Otro punto muy importante sobre el cual es necesario profundizar es el efecto de aplicaciones repetidas del herbicida, que ha sido escasamente abordado (Busse *et al.*, 2001; de Andrea *et al.*, 2003; Lancaster *et al.*, 2010), en comparación con el gran número de estudios basados en aplicaciones únicas. Más aún, dentro de las investigaciones sobre los efectos de aplicaciones repetidas, muy pocas se han focalizado en grupos de microorganismos involucrados en procesos de relevancia ecológica. Diversos autores han reconocido la necesidad de identificar y evaluar grupos claves o “keystone” como indicadores de impacto ambiental (Domsch *et al.*, 1983; Beare *et al.*, 1995) y los microorganismos nitrificantes han sido propuestos dentro de los de mayor sensibilidad (Domsch *et al.*, 1983). En particular, para bacterias oxidantes del amoníaco (BOA), no existe

INTRODUCCIÓN GENERAL

información disponible sobre los posibles efectos que podría tener la acumulación de aplicaciones de glifosato en la abundancia y en la estructura de la comunidad. El Capítulo 2 de la Tesis se ocupará de esta temática y representa uno de los primeros estudios de BOA frente a glifosato (Allegrini *et al.*, 2017).

El Capítulo 3 de esta Tesis abordará otro aspecto de gran relevancia y que no ha sido considerado en estudios previos sobre impacto de glifosato: el análisis de la interacción entre la exposición a glifosato y a un ciclo de desecación-humedecimiento, un factor de disturbio recurrente en el ambiente edáfico. Asimismo, se determinará cómo afecta este disturbio a nivel fisiológico a comunidades microbianas de un suelo con y sin historia del herbicida. Este interrogante guarda una especial relación con el concepto PICT (Capítulo 1) dado que el incremento de tolerancia a un contaminante puede conllevar un costo asociado, en particular, un incremento en la sensibilidad a ciertos estreses o disturbios secundarios (Clements y Rohr, 2009; Azarbad *et al.*, 2016). De hecho, se ha determinado que la reducción en la diversidad catabólica (diversidad funcional) y en las propiedades del suelo debida a su uso intensivo podría afectar la resistencia de las comunidades microbianas (Degens *et al.*, 2001).

Finalmente, como se ha mencionado en la sección anterior, la mayoría de los estudios sobre efectos del glifosato en comunidades microbianas del suelo se han centrado en la rizosfera de cultivos resistentes o bien en suelo no rizosférico (*bulk soil*). No obstante, un número considerablemente menor de estudios ha abordado la comparación de comunidades microbianas de la rizosfera de plantas sensibles, sometidas a tratamientos con glifosato y sin empleo de herbicidas (ej.: corte de la planta) (Mijangos *et al.*, 2009; Druille *et al.*, 2015; Imparato *et al.*, 2016). Los cultivos de cobertura constituyen un claro ejemplo a nivel agronómico de cultivos sensibles a glifosato, tratados con este herbicida durante la etapa de finalización o supresión. Existen también otros métodos de finalización completamente diferentes que no emplean agentes químicos y que se basan en la acción mecánica como el corte o el rolado. Al respecto, cabe plantearse entonces si las comunidades microbianas de la rizosfera de plantas tratadas con glifosato difieren de las comunidades rizosféricas de plantas finalizadas sin herbicida. En el último capítulo (Capítulo 4) se describirán los resultados de un estudio realizado en comunidades microbianas de la rizosfera de *Avena sativa* L. comparando los efectos de ambos métodos de finalización.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el impacto del herbicida glifosato en comunidades microbianas de suelos de la Región Pampeana.

Contribuir al desarrollo de bioindicadores apropiados para integrar a un marco de referencia en la evaluación de la sustentabilidad ambiental de prácticas agrícolas en la región, que puedan ser aplicados en programas de monitoreo en el largo plazo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la tolerancia de las comunidades microbianas a glifosato en suelos con y sin historia del herbicida y determinar si existe una respuesta PICT detectable.
- Evaluar el impacto de aplicaciones sucesivas de glifosato a nivel de microcosmos en comunidades microbianas de suelos con y sin historia de exposición al herbicida.
- Evaluar la respuesta fisiológica de comunidades microbianas frente a un factor de disturbio (desección-humedecimiento) en microcosmos de suelos con y sin historia del herbicida a campo.
- Analizar las modificaciones en la comunidad bacteriana y en grupos específicos (BOA, AOA, *Actinobacteria*) frente a la exposición aguda a glifosato y a desecación-humedecimiento. Determinar si existe interacción entre los efectos de ambos factores.
- Estudiar el impacto de la desecación de un cultivo de cobertura (*Avena sativa* L.) con glifosato sobre comunidades microbianas de la rizosfera en relación a un método de finalización sin herbicida.

CAPÍTULO 1

EVALUACIÓN ECOTOXICOLÓGICA DE LA TOLERANCIA DE COMUNIDADES MICROBIANAS DEL SUELO A GLIFOSATO

Allegrini, M., Zabaloy, M.C., Gómez, E. (2015). *Ecotoxicological assessment of soil microbial community tolerance to glyphosate. Science of the Total Environment* 533, 60-68.

1. Introducción

Diversos factores, entre ellos los herbicidas, pueden afectar los procesos microbianos que contribuyen a la provisión de servicios ecosistémicos, reduciendo la sustentabilidad funcional de los suelos (Tilman, 2002). Los efectos de contaminantes en el ambiente pueden ser investigados a diferentes niveles. Por diversos motivos, las comunidades son consideradas un nivel apropiado de organización biológica para el estudio de estos efectos (Clements y Rohr, 2009). Dado que las comunidades se encuentran en el nivel medio entre poblaciones y ecosistemas, pueden ofrecer importantes perspectivas en relación a los mecanismos por los cuales los contaminantes ejercen sus efectos a niveles inferiores, pero a la vez están íntimamente conectados con parámetros ecológicamente relevantes en los niveles superiores (ej.: servicios ecosistémicos). En este sentido, la evaluación de comunidades microbianas mediante la estrategia de tolerancia de la comunidad inducida por el contaminante (PICT), mencionada en la Introducción General (Sección 3.5), ha sido propuesta como una herramienta o indicador ecotoxicológico para evaluar la existencia o ausencia de efectos de los contaminantes en los ecosistemas (Blanck, 2002). La teoría PICT se fundamenta en el principio de que las comunidades frecuentemente desarrollan una tolerancia incrementada a un determinado contaminante luego de una exposición prolongada (Blanck *et al.*, 1988). Diferentes mecanismos pueden conducir a este comportamiento:

- Muerte de las especies menos tolerantes de la comunidad y reemplazo por las más tolerantes.
- Adaptación fisiológica de los individuos.
- Selección de los genotipos más tolerantes en una población.

Las comunidades intactas son muestreadas de sitios contaminados y de referencia y posteriormente expuestas a dosis crecientes de contaminante realizando mediciones de un parámetro de detección sensible al contaminante (fase de detección). La detección de un incremento en la tolerancia es considerada una fuerte evidencia de que el contaminante ha ejercido un efecto sobre la comunidad (Demoling y Bååth, 2008). Un estudio PICT consiste

en dos fases bien diferenciadas: una fase de selección, en donde la comunidad es expuesta al contaminante en su ambiente natural (o seminatural), y una fase de detección en donde la comunidad es muestreada y la tolerancia al contaminante es medida en condiciones definidas luego de una exposición corta a dosis crecientes. En la fase de selección los compuestos químicos ejercen su presión de selección a través de algunos de los mecanismos antes mencionados (ej.: eliminación de especies sensibles) (Blanck, 2002). Esta fase es la que otorga sensibilidad y relevancia ecológica a la metodología PICT (Blanck *et al.*, 1988). En este punto es importante destacar que, en estudios a campo, la composición de la nueva comunidad puede ser el resultado de diferentes factores ambientales que actúan en forma simultánea sobre la estructura. Por lo tanto, no sería posible establecer causalidad dado que sólo una parte de las propiedades serían debidas al impacto del contaminante. La siguiente fase de detección es la que otorga causalidad al estudio PICT. En esta fase, se detecta experimentalmente cuán relacionados están los cambios en la comunidad con los cambios en la tolerancia (Blanck, 2002).

La fase de selección en un estudio PICT puede haber ocurrido a campo o bien puede ocurrir en ecosistemas experimentales bajo condiciones controladas. En el primer caso, la estrategia PICT es utilizada retrospectivamente para detectar los efectos que ya se han producido sobre las comunidades bajo estudio (Blanck, 2002). En este caso, la naturaleza propia del estudio es mensurativa u observacional (no manipulativa) (Hurlbert, 1984). Se muestrean comunidades intactas de sitios expuestos crónicamente al contaminante y de sitios de referencia, a las que se somete a la fase de detección (Clements y Rohr, 2009). Hablamos de “*sitio de referencia*” dado que un sitio control con idénticas características al sitio impactado (excepto la exposición) no se encuentra disponible en la mayoría de los casos (Smith *et al.*, 1993). La ventaja principal del muestreo a campo está relacionada con la posibilidad de elección de un sitio en el que la fase de selección ha ocurrido durante un tiempo suficientemente prolongado como para asegurar esa selección, es decir, para que ocurra la serie de eventos que conducen a la comunidad hacia un estado de mayor tolerancia (Blanck, 2002). Otra de las ventajas radica en que las medidas de tolerancia a un contaminante específico son menos afectadas por la variación ambiental natural entre sitios en la estrategia PICT respecto de otras metodologías. Por lo tanto, la selección de sitios de referencia y contaminados con idénticas propiedades no es un aspecto crítico (Clements y Rohr, 2009). Las variaciones en la tolerancia responderán en mayor medida a diferencias en la exposición directa al contaminante más que a diferencias en las variables fisicoquímicas de cada tipo de suelo (Siciliano y Roy, 1999; Gong *et al.*, 2000; Zabaloy *et al.*, 2011).

CAPÍTULO 1

El estudio PICT más reciente de un herbicida (2,4-D) fue reportado por Zabalo *et al.* (2010) utilizando el sistema de medición de respiración microbiana BDOBS (Wodnicka *et al.*, 2000), comparando suelos agrícolas y forestales. En este estudio se encontró que la respiración del ácido *p*-cumárico podía ser utilizada como un parámetro de detección ecológicamente relevante que refleja los efectos tóxicos del herbicida a nivel de la comunidad. Asimismo, la estrategia PICT ha sido empleada previamente en múltiples oportunidades para estudiar los efectos de diferentes químicos (antibióticos, compuestos fenólicos, herbicidas) en comunidades microbianas del suelo empleando diferentes métodos de detección (Gong *et al.*, 2000; Seghers *et al.*, 2003; Schmitt *et al.*, 2004). Sin embargo, no existen reportes aún de un ensayo PICT con glifosato, por lo tanto se desconoce si la exposición prolongada podría conducir a un incremento en la tolerancia. La aplicación de esta estrategia ecotoxicológica es de gran importancia como un primer indicador indirecto de impacto ya que permite determinar si existe una tolerancia incrementada en suelos crónicamente expuestos que pueda relacionarse con posibles cambios en la estructura de la comunidad.

Los pesticidas son comercializados como formulados que contienen al IA y diversos químicos (aditivos o adyuvantes, designados como “ingredientes inertes”) que mejoran las aplicaciones y la estabilidad (Cox y Sargan, 2006). La toxicidad de los ingredientes inertes debe ser considerada, aun cuando los mismos son raramente informados. Los ensayos deben evaluar los ingredientes activos, el formulado comercial y si la composición del formulado es conocida (no confidencial) también se debe considerar los aditivos en forma separada (Pérez *et al.*, 2011). Varios autores han cuestionado la utilización de datos ecotoxicológicos basados únicamente en el IA, demostrando que los “ingredientes inertes” pueden contribuir a la toxicidad del formulado, tanto por su inherente toxicidad como por la interacción con el IA (Krogh *et al.*, 2003; Sihtmäe *et al.*, 2013). Algunos estudios han indicado una mayor toxicidad de los FC de glifosato en organismos no blanco en relación a los correspondientes ingredientes activos, tanto para eucariotas (Cedergreen y Streibig, 2005) como para procariotas (Qiu *et al.*, 2013). Asimismo, ciertos estudios indican que altas concentraciones de los surfactantes no iónicos normalmente encontrados en los pesticidas (diferentes compuestos etoxilados) pueden incrementar la movilidad de determinados pesticidas adsorbidos en la matriz del suelo, mientras que a concentraciones bajas ejercen el efecto contrario (Krogh *et al.*, 2003). En base a estas consideraciones, en el presente capítulo se describirán los resultados del estudio PICT tanto para el IA como para un FC del herbicida.

2. Objetivo específico

Evaluar la tolerancia de comunidades microbianas a glifosato en suelos con y sin historia de exposición al herbicida y determinar si existe una respuesta PICT detectable.

3. Hipótesis

A través de la estrategia PICT se puso a prueba la siguiente hipótesis: los suelos con historia de exposición a glifosato presentarán una mayor tolerancia respecto de los sitios de referencia (sin historia) debido a una presión de selección en la estructura de la comunidad. La predicción correspondiente es que glifosato ejercería un efecto gradual mediante cambios relativos en la eficiencia de crecimiento, disminuyendo lentamente la abundancia de especies sensibles que invierten energía en respuesta al estrés e incrementando la abundancia de aquellas adaptadas al rápido uso de recursos nutricionales producidos como resultado del cometabolismo.

4. Materiales y métodos

4.1 *Sitios de estudio y muestreo de suelos*

Se analizaron suelos de Coronel Dorrego (DOR, Pcia. de Buenos Aires), Mayor Buratovich (BUR, Pcia. de Buenos Aires) y Zavalla (ZAV, Pcia. de Santa Fe), correspondientes a la Región pampeana semiárida (DOR y BUR) y a la Pampa húmeda (ZAV). En cada localidad se estudiaron dos sitios contrastantes: un sitio con historia de exposición al herbicida ("H") y otro sin historia ("NH").

En Coronel Dorrego los suelos fueron muestreados en el establecimiento Cumelén (38°47'S, 61°38'W). La historia de exposición del suelo agrícola con historia de glifosato (DOR_H) fue de 20 años (cultivo de trigo), mientras que el suelo NH fue muestreado de un sitio adyacente (parque) con plantación de pinos. En Mayor Buratovich (39°17'20"S, 62°37'15"W), el suelo H (BUR_H) presentó una historia de exposición de 8 años al momento del muestreo y fue muestreado en parcelas de olivos en los alrededores de las plantas en donde el glifosato es aplicado (<1m del tronco), mientras que el suelo NH (BUR_{NH}) corresponde al espacio entre parcelas nunca tratado con el herbicida. Por último, en el caso de Zavalla (33°02'23"S, 60°53'05"W), el suelo H (ZAV_H) fue muestreado en un lote del Campo Experimental Villarino (Facultad de Ciencias Agrarias, UNR) con 19 años de historia de glifosato al momento del muestreo (cultivo continuo de soja), mientras que el suelo NH (ZAV_{NH}) fue muestreado en un sitio cercano dentro del Parque J.F. Villarino con vegetación forestal (Facultad de Ciencias Agrarias, UNR).

CAPÍTULO 1

Los suelos de Zavalla son Argiudoles vérticos mientras que los de Mayor Buratovich y Coronel Dorrego corresponden a Haplustoles típicos. Las propiedades fisicoquímicas de los mismos, proporcionadas por el Laboratorio Nacional de Investigaciones y Servicios de Nitrógeno 15 CONICET – UNS (LANAIS N-15), se encuentran indicadas en la Tabla 3.

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas más importantes de los suelos con (H) y sin historia (NH) de exposición a glifosato. Los datos indicados se expresan en g kg⁻¹ de peso seco y corresponden a la media de tres mediciones sobre una muestra compuesta de cada sitio (no se realizaron comparaciones estadísticas, los datos se presentan sólo a modo descriptivo). ZAV: Zavalla, DOR: Coronel Dorrego, BUR: Mayor Buratovich.

Características	Sitios sin historia (NH)			Sitios con historia (H)		
	ZAV _{NH}	DOR _{NH}	BUR _{NH}	ZAV _H	DOR _H	BUR _H
Arena (g kg ⁻¹)	116	450	628	103	450	628
Limo (g kg ⁻¹)	490	359	266	491	359	266
Arcilla (g kg ⁻¹)	394	191	106	406	191	106
Clase textural*	FAL to AL	F	FR	FAL to AL	F	FR
pH _{H2O} (1:2,5 p/v)	6,7	6,6	7,4	5,5	6,2	7
Materia orgánica (g kg ⁻¹)	39,3	29,2	29,1	44,1	23,8	11,5

*FAL= franco arcilloso limoso; F= franco; AL= arcilloso limoso; FR= franco arenoso

El muestreo de los suelos se llevó a cabo en el mes de Noviembre de 2013. Debido a la naturaleza observacional o mensurativa del estudio (no manipulativo), las fuentes de error asociadas con la imposibilidad de asignar aleatoriamente los tratamientos (historia vs no historia de glifosato) en unidades experimentales fueron minimizadas mediante la obtención de tres muestras compuestas provenientes de tres sectores distanciados y seleccionados aleatoriamente en cuanto a su disposición en cada sitio estudiado ($n=3$). Esto permite dispersar las mediciones en tres sectores dentro del lote de muestreo de modo de considerar la variabilidad espacial de las mismas, tal como ha sido sugerido por Hurlbert (1984) para experimentos mensurativos u observacionales comparativos. Otros estudios han enfrentado también esta dificultad, bastante frecuente en estudios observacionales a campo (a diferencia de los estudios manipulativos), adoptando el procedimiento de selección de sectores aleatorios mencionado anteriormente (Gómez *et al.*, 2000; Bardgett *et al.*, 2001; Gómez *et al.*, 2004). La superficie de cada uno de los tres sectores fue de 350 m². En cada uno estos tres sectores se tomaron 15 submuestras superficiales (0-5 cm) con pala corta de mano para conformar cada una de las tres muestras compuestas con las que se trabajó posteriormente ($n=3$). La capa superior de materia orgánica (hojarasca) fue removida en los sitios no disturbados sin historia de glifosato previo a la extracción de las submuestras. El suelo con la humedad de campo fue inmediatamente tamizado (<5,6 mm) para análisis ecotoxicológico y almacenado a 4 °C hasta su uso. Una porción de esa muestra fue separada y almacenada a -20°C para la caracterización mediante un análisis fisiológico y

molecular. Asimismo, una fracción del suelo muestreado en cada sitio se destinó al análisis químico luego del secado (110°C) y tamizado (<2 mm) (Tabla 3).

4.2 Caracterización fisiológica y molecular de sitios con y sin historia de glifosato

4.2.1 Perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas (CLPP)

Las medidas de respiración de la comunidad microbiana en presencia de diferentes sustratos carbonados (SC) se realizaron en base al oxígeno consumido utilizando el sistema fluorescente de microplacas sensoras BDOBS (BD Oxygen Biosensor System®), descrito en la Introducción General. La señal proveniente del complejo fluoróforo-gel en el fondo de los pocillos de la microplaca se incrementa concomitantemente con el consumo de oxígeno durante la respiración de la comunidad microbiana en la muestra analizada.

Para la obtención de los perfiles fisiológicos se analizó la respiración en presencia de siete SC de diferente tipo (aminoácidos, azúcares y ácidos orgánicos): L-asparagina, L-fenilalanina, L-sarcosina, D-manosa, D-glucosa, acetato de sodio y ácido *p*-cumárico (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). La selección de L-asparagina, L-fenilalanina, D-manosa, D-glucosa y ácido acético se realizó principalmente en base a otros estudios en los cuales estos sustratos fueron considerados también para el análisis de tratamientos con glifosato (Busse *et al.*, 2001; Zabaloy *et al.*, 2012). Asimismo, estos sustratos se encuentran dentro de los sugeridos por Insam (1997) para la adecuada caracterización de muestras ambientales mediante CLPP. Por su parte, la selección de sarcosina responde a que este compuesto es el producto directo de la degradación de glifosato por microorganismos del suelo a través de la actividad C-P liasa (Sección 1.3.2 de la Introducción General). Las consideraciones para la selección del ácido *p*-cumárico como representante dentro de los ácidos carboxílicos de tipo aromáticos se detallarán en la Sección 4.3. También se incluyó un control con agua deionizada estéril en lugar de un sustrato carbonado de manera tal de medir también la respiración basal (RB). Las soluciones madre de los sustratos (150 mg l⁻¹) fueron esterilizadas por filtración (Sartorius Minisart 0,2 µm) y almacenadas a 4°C hasta su uso. Las microplacas fueron cargadas con 100 µl de la solución de sustrato (concentración final 50 mg l⁻¹) en los correspondientes pocillos. Las suspensiones de suelo:agua deionizada estéril se prepararon mediante agitación con vórtex durante 2 min en tubos de centrifuga de polipropileno estériles (50 ml) con un volumen de 5 ml de esferas de vidrio también estériles (Ø 2 mm). Las relaciones suelo:agua utilizadas en cada caso fueron 1:7,5 (ZAV y DOR) y 1:2,5 (BUR). Una vez preparadas, las suspensiones (200 µl) fueron cargadas inmediatamente en la placa conteniendo los diferentes sustratos (volumen final= 300 µl). La

cantidad de suelo inoculada (asumiendo completa homogeneidad de la suspensión) corresponde a 26,5 mg/pocillo (ZAV y DOR) y 80 mg/pocillo (BUR). Por su parte, las cantidades de sustratos inoculados corresponden a niveles de 566 $\mu\text{g g}^{-1}$ suelo para ZAV y DOR, y de 187,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ suelo para BUR. En todos los casos, tanto para los sustratos como para las suspensiones de suelo, se utilizó una pipeta de repetición Minilab 201 (HTL LAB Solutions) para dispensar las correspondientes cantidades en una cabina de flujo laminar. Las medidas cinéticas de fluorescencia se registraron desde el fondo de la placa (*bottom-reading*) cada 15 min durante 24 hs en un lector de fluorescencia para microplacas FLUOstar Optima (BMG Labtech, Offenburgo, Alemania), a una temperatura constante de 30°C utilizando un filtro de excitación de 470 nm y uno de emisión de 610 nm.

4.2.2 Análisis molecular de comunidades microbianas

4.2.2.1 Extracción de ADN de la comunidad

Las muestras de suelo fueron pesadas (250 mg) y procesadas con el kit comercial Ultra CleanSoil DNA/RNA Extraction kit, MoBio, Carlsbad, CA), siguiendo las especificaciones del fabricante. El ADN obtenido fue cuantificado en un fluorómetro Quantus (Promega) usando el kit QuantiFluor dsDNA (Promega).

4.2.2.2 PCR cuantitativa (qPCR) de bacterias totales

Se utilizaron los cebadores universales para *Eubacteria* Eub338F y Eub518R (Tabla 4), los cuales amplifican una región de 200 pb del gen que codifica para el ARNr 16S (Fierer *et al.*, 2005). La composición de la mezcla de reacción (15 μl) fue la siguiente: 7,5 μl de PCR iTaq Universal SYBR Green Supermix (2x, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), 0,45 μl de cada cebador (soluciones madre 10 μM ; Invitrogen); 5,6 μl de agua bidestilada estéril y 1 μl de ADN molde ($\sim 1\text{--}10\text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: pre-incubación (95 °C, 5 min, 1 ciclo), amplificación (95 °C 15 s, 53 °C 30 s, 72 °C 45 s, 35 ciclos), seguido del análisis de las curvas de fusión (65 °C–95 °C) en un equipo de PCR en tiempo real ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA). El número de copias de las muestras fue calculado a partir de una curva de calibrado construida con un estándar de ADN genómico de *E. coli* DH5 α diluido serialmente para obtener entre 10^7 y 10^3 copias del gen. El número de copias del estándar se obtuvo considerando su absorbancia a 260 nm, el tamaño del genoma de *E. coli* (4,64 Mb) y la presencia de 7 copias del operón *rnm* en esta especie. El número de copias obtenido de la curva de calibrado fue expresado en función de las correspondientes cantidades de ADN en el volumen utilizado en la reacción de PCR, de manera de considerar las diferencias de eficiencia durante el proceso de extracción y purificación del ADN que influyen sobre el rendimiento final a partir de una

CAPÍTULO 1

misma masa de suelo (Sharma *et al.*, 2007). Diferentes autores se han basado en esta misma consideración (ej.: Marcos *et al.*, 2012; Zabaloy *et al.* 2016a).

Tabla 4. Cebadores utilizados para PCR seguido de electroforesis en gradiente de desnaturalizante (PCR-DGGE) y para PCR cuantitativa (qPCR) de bacterias totales. Las letras en negrita indican cebadores directos (F) o reversos (R).

Cebador	Secuencia (5'→ 3')	Producto (pb)	Gen	Referencia
Eub338 F Eub518 R (qPCR)	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG ATTACCGCGGCTGCTGG	200	ARNr 16S	Fierer <i>et al.</i> (2005)
984 F -clamp ^a 1378 R (PCR-DGGE)	AACGCGAAGAACCTTAC CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG	490	ARNr 16S	Heuer <i>et al.</i> (1997)

^a clamp: Extensión rica en GC ligada al cebador directo (F) para PCR-DGGE: 5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG-3' (Muyzer *et al.*, 1993)

4.2.2.3 PCR-DGGE de bacterias totales

Las reacciones de PCR para el análisis posterior por DGGE se realizaron considerando únicamente los sitios más contrastantes en cuanto a su historia de exposición a glifosato, es decir, el de mayor (ZAV) y menor (BUR) historia. Asimismo, se consideraron sólo dos de las tres muestras de cada sitio (H y NH). Dado que esta metodología se empleó a modo de caracterización previa al ensayo PICT (ya que no es posible asignar causalidad a cualquier diferencia que pudiera observarse en la comparación de sitios H y NH) se consideró suficiente la inclusión de sólo dos muestras de cada sitio para cumplir con dicha finalidad.

Se utilizó el par de cebadores 984F-clamp/1378R para amplificar la región V6-V8 del gen del ARNr 16S de *Eubacteria* (Heuer *et al.*, 1997). El cebador directo posee una extensión rica en GC de 40 nucleótidos en el extremo 5', de manera de evitar el desprendimiento completo de las hebras en los fragmentos amplificados al producirse la desnaturalización (Muyzer *et al.*, 1993). A partir del ADN extraído del suelo, se llevaron a cabo reacciones de PCR en duplicado (25 µl) para las distintas muestras. Los productos de las mismas fueron combinados antes de ser sembrados en el gel de poliacrilamida. La composición de la mezcla de reacción fue la siguiente: 1,25 µl de dimetilsulfóxido (DMSO, madre 100% V/V), 1,5 µl de cloruro de magnesio (solución madre 25 mM), 2,5 µl de deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs, solución madre 2 mM, Inbio Highway, Argentina), 5 µl de GoTaq Green Flexi *buffer* 5x (Promega), 0,75 µl de cada cebador (soluciones madre 10 µM), 0,125 µl de polimerasa GoTaqMDx Hot Start (5 U/µl) (Promega Corp., Madison, WI, USA) y agua bidestilada estéril en cantidad suficiente para 25 µl. Previo a ser cargados en el gel de poliacrilamida, los productos de PCR fueron sembrados en geles de agarosa 2% y corridos durante 40 min a

70V para chequear el correcto tamaño del amplicón (490 pb) y la presencia de una única banda. La electroforesis de los productos de PCR se llevó a cabo en un equipo Scie-Plas TV400-DGGE System (SciePlas, Cambridge, UK). Los geles de poliacrilamida (8% de una mezcla 37:1 acrilamida–bisacrilamida en buffer TAE 1x), con un gradiente de desnaturalizante 50–70%, fueron preparados con un generador de gradiente (Scie-Plas) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. El 100% de desnaturalizante es definido por una concentración de urea 7M y formamida deionizada 40% (Green *et al.*, 2009). Los productos de PCR (40 µl/calle) fueron sembrados en el gel de *stacking* 0% en calles separadas entre sí por calles vacías y corridos durante 16 hs a 100 V en buffer TAE 1x (pH 7.4) a una temperatura constante de 60°C. Los amplicones del gen *del ARNr 16S* de *Pseudomonas mendocina* y de *Alcaligenes faecalis* fueron utilizados como marcadores y designados como posiciones internas de referencia para la normalización del gel. Una vez finalizada la corrida, el gel fue extraído del equipo y colocado directamente en la solución de tinción durante 40 min. Para la tinción se utilizó Gel Red 3x (Biotium, Hayward, CA, USA). El gel fue visualizado en una cabina con luz UV, fotografiado y digitalizado utilizando el software Kodak Digital Science Image Analysis versión 3.0 (Eastman Kodak Company, NY).

4.3 Ensayo de tolerancia de la comunidad inducida por el contaminante (PICT): fase de detección

Para la fase de detección del ensayo PICT, las placas fueron inoculadas con 100 µl de una solución madre de ácido *p*-cumárico (concentración final 50 mg l⁻¹) y 100 µl de diferentes soluciones madre de glifosato (Pestanal™ grado analítico, sal de potasio N-(fosfonometil)glicina, 99,7%), de manera tal de alcanzar concentraciones crecientes en los pocillos (0, 3, 15, 30, 150, 300 y 1500 mg l⁻¹) del ingrediente activo (IA). En el caso del formulado comercial, se utilizó el producto Roundup Full II (Monsanto™, IA: sal de potasio N-(fosfonometil)glicina 66,2% (P/V), aditivos no especificados debido a información confidencial). Se prepararon las correspondientes diluciones de manera tal de alcanzar las mismas concentraciones de IA que las indicadas en el caso anterior. Las soluciones madre esterilizadas por filtración (Sartorius Minisart 0,2 µm) fueron almacenadas a 4°C en la oscuridad y utilizadas inmediatamente (menos de una semana). Las relaciones suelo:agua utilizadas en este ensayo para las suspensiones fueron 1:7,5 para ZAV, 1:5 para DOR y 1:2,5 para BUR. El procedimiento de preparación fue el mismo que el descrito anteriormente en la Sección 4.2. Se cargaron 100 µl de suspensión de suelo en la placa de manera tal de alcanzar un volumen final de 300 µl en cada pocillo. Las condiciones de medición en el lector de fluorescencia para microplacas fueron las mismas que las indicadas anteriormente. La selección del ácido *p*-cumárico como sustrato para el análisis respiratorio

durante la fase de detección se centró en tres aspectos principales. En primer lugar, Zabaloy *et al.* (2010) demostraron que la respiración inducida por este sustrato puede ser utilizada adecuadamente en la fase de detección del ensayo PICT como indicador de toxicidad frente a concentraciones crecientes de otro herbicida (2,4-D) utilizando el sistema BDOBS. Asimismo, la respiración en presencia de este sustrato en el sistema BDOBS mostró sensibilidad en microcosmos a una dosis alta de glifosato (150 mg kg^{-1}) (Zabaloy *et al.*, 2012). En segundo lugar, es un sustrato directamente relacionado con el modo de acción del glifosato ya que es sintetizado a partir de aminoácidos aromáticos (L-fenilalanina y L-tirosina), cuya síntesis es inhibida por glifosato. El glifosato induce la acumulación de ácidos hidroxibenzoicos, entre ellos el protocatecuato, un intermediario en el catabolismo del ácido *p*-cumárico (Sutherland *et al.*, 1983; Moorman *et al.*, 1992). Este aspecto será discutido en detalle en la Sección 6. En tercer lugar, es un sustrato ecológicamente relevante: la degradación de la lignina por microorganismos específicos del suelo libera ácido *p*-cumárico como uno de los principales fenilpropanoides, posteriormente catabolizados como fuente de C y energía (Sutherland *et al.*, 1983; Peng *et al.*, 2003; Bugg *et al.*, 2011). Por lo tanto, este indicador es sensible a aquellas alteraciones en poblaciones degradadoras de la lignina y por lo tanto al ciclado de C edáfico.

4.4 Análisis de datos

4.4.1 Perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas

Las lecturas a cada punto de tiempo (unidades relativas de fluorescencia, RFU) fueron divididas por la respuesta a 1 h de manera tal de expresar los datos como unidades relativas de fluorescencia normalizadas (NRFU). Se seleccionó dicho tiempo de normalización para permitir el equilibramiento de la temperatura dada la sensibilidad del fluoróforo de rutenio a la temperatura (Freese *et al.*, 2010). Los valores de NRFU fueron graficados vs tiempo (hs) para obtener las curvas de respiración. El área integrada bajo la curva de respiración (AUC) fue calculada para el período 1-6 hs para los suelos de ZAV y DOR, y entre 1-4 hs para BUR, utilizando el software SigmaPlot 10.0 (Systat Software, Inc., San José, CA, USA). Estos períodos iniciales de tiempo (menores a 8 hs) fueron seleccionados para incluir sólo la respuesta respiratoria de poblaciones microbianas que no se encuentren en crecimiento activo, de acuerdo con la definición de respiración inducida por el sustrato (SIR) (Horwath y Paul, 1994; Nannipieri *et al.*, 2003). El AUC (NRFU*hora) corresponde al oxígeno consumido por la biomasa presente originalmente en la muestra, durante el tiempo de medición (Zabaloy *et al.*, 2016a). Se calculó un cociente respiratorio (RQ) a partir de los datos de respiración inducida con cada sustrato (SIR), análogo al cociente metabólico ($q\text{CO}_2$)

(Anderson y Domsch, 1993) y al índice de disponibilidad de C (Cheng *et al.*, 1996), y definido como el AUC en presencia del carbono endógeno del suelo (AUC_{RB}) sobre el AUC en presencia del sustrato carbonado (AUC_{SC}). Es decir, $RQ = AUC_{RB} / AUC_{SC} = RB / SIR$ (Zabaloy *et al.*, 2016b). La biomasa que responde inmediatamente a los sustratos carbonados se encuentra indicada por AUC_{SC} (Garland *et al.*, 2012; Lehman *et al.*, 2013; Zabaloy *et al.*, 2016a). Para determinar la equitatividad de uso de sustratos en cada suelo, se analizó el parámetro E , un componente de la diversidad funcional de las comunidades microbianas (Degens *et al.*, 2001). El parámetro E se calculó de la siguiente manera:

$E = 1 / \sum p_i^2$, donde $p_i = r_i / \sum r_i$ y r_i = respuesta respiratoria con cada sustrato hasta las 6 hs (ZAV y DOR) o hasta 4 hs (BUR) (Degens *et al.*, 2001).

4.4.2 Ensayo PICT: estimaciones de tolerancia

Las curvas de respiración fueron obtenidas como se indicó anteriormente en la Sección 4.5.1. Para evaluar los efectos del herbicida (IA y FC) en la respiración del ácido *p*-cumárico, se seleccionó como parámetro de medición el área integrada bajo la curva (AUC) entre 1 y 8 hs. Los períodos de tiempo comprendidos hasta las 8 hs iniciales desde la preparación de la placa evitan el *turnover* de la biomasa microbiana muerta por efecto del herbicida con sus consecuentes efectos sobre la SIR (Velvis, 1997) y la degradación del herbicida en la placa que enmascararían los efectos tóxicos sobre la biomasa existente al inicio del ensayo (Zabaloy *et al.*, 2010). El AUC de los pocillos con 0 mg l⁻¹ de glifosato fue definida como el 100% de la respuesta y el AUC correspondiente a las diferentes dosis fue expresada como un porcentaje de dicho valor (índice respiratorio, IR).

Las curvas dosis-respuesta (IR vs dosis) fueron ajustadas como se indica en la próxima sección y los valores correspondientes a la dosis inhibitoria media máxima (IC50), con su promedio y error estándar, fueron estimados para los suelos H y NH mediante el paquete *drc* del software estadístico R. Para el cálculo del parámetro IC50, el límite superior de la respuesta fue siempre el valor del control (IR=100%).

4.4.3 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos de respiración inducida por los diferentes sustratos (AUC) y de los RQ se llevó a cabo mediante un test-t para muestras independientes ($\alpha=0,05$) utilizando el software estadístico R v.3.0.2 (R Development Core Team, 2013). La normalidad de los datos en todos los casos fue verificada mediante el test de Shapiro-Wilks modificado ($\alpha=0,05$) y mediante comprobación gráfica (Q-Q plot). Se utilizó la corrección para variancias desiguales en aquellos casos donde se observó esta desigualdad. El mismo

test estadístico (test-t para muestras independientes) se empleó para análisis del número de copias (\log_{10}) del gen que codifica para el ARNr 16S.

Para el ensayo PICT, las curvas dosis-respuesta de suelos H y NH fueron ajustadas simultáneamente (ajuste múltiple de curvas dosis-respuesta: Ritz y Streibig, 2012) utilizando modelos no lineales de ajuste para comportamientos de hormesis utilizando el paquete estadístico *drc* del software R (Ritz y Streibig, 2013). Se utilizaron los modelos Cedergreen–Ritz–Streibig (CRS) y Brain-Cousens (BC) que incluyen un parámetro de hormesis y el modelo Gaussiano (GAU) (descritos en el Anexo I), ampliamente utilizados para estudios toxicológicos con herbicidas en presencia de fenómenos de hormesis, de acuerdo con Ritz y Streibig (2012) y Knezevic *et al.* (2007). Se utilizó una transformación de tipo Box-Cox para cumplir con los supuestos de normalidad y homocedasticidad en aquellos casos donde uno o ambos requisitos no se verificaron. Esta transformación es la recomendada en el paquete *drc* cuando se trabaja con datos ajustados a modelos no lineales de hormesis como los mencionados anteriormente (Ritz y Streibig, 2012). La normalidad fue verificada mediante el test de Shapiro Wilks modificado ($\alpha=0,05$) y mediante comprobación gráfica (Q-Q plot), y la homocedasticidad mediante comprobación gráfica (residuos vs predichos). El ajuste de los modelos fue evaluado mediante el test estadístico *lack-of-fit* ($\alpha=0,05$) (Knezevic *et al.*, 2007). La comparación estadística de los valores de IC50 se llevó a cabo mediante el cálculo de un índice de selectividad (IS) o “*selectivity index*” (Ritz y Streibig, 2012), definido como la relación entre los valores de IC50 de las dos curvas ajustadas (suelos H y NH), en este caso $IS = IC50_H / IC50_{NH}$. De acuerdo a lo descrito por Ritz y Streibig (2012), este índice es un indicador de la potencia relativa, en este caso, del herbicida glifosato en los dos sitios comparados (H y NH). El paquete *drc* permite calcular este índice y proporciona un valor de probabilidad asociada que indica si la relación es significativamente diferente de 1, a través de un estadístico *t* (Knezevic *et al.*, 2007).

En lo que respecta a los perfiles electroforéticos obtenidos mediante DGGE, se utilizó el software GelCompar IITM v. 4.6 (Applied Maths, Kortrijk Bélgica) para el análisis. Las similitudes entre los distintos pares de perfiles densitométricos (matriz de similitud) se evaluaron mediante el coeficiente producto-momento de correlación de Pearson (*r*) mientras que para el agrupamiento se utilizó el algoritmo UPGMA (agrupamiento pareado no ponderado utilizando media aritmética), según se recomienda para el análisis de perfiles obtenidos mediante DGGE (Montecchia *et al.*, 2011). Se calcularon los coeficientes de correlación cofenética en cada nodo del dendrograma para verificar la consistencia del agrupamiento. Asimismo, para evaluar la estabilidad interna (significancia) de los grupos, se

CAPÍTULO 1

utilizó el método de re-muestreo Jackknife basado en similitudes promedio (GelCompar II™ v. 4.6, Software Manual).

5. Resultados

5.1 Perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas

Los perfiles de utilización de sustratos carbonados de las tres localidades (ZAV, DOR y BUR) se encuentran indicados en la Figura 3 (A-C). Se observaron diferencias significativas ($P<0,05$) en las respuestas respiratorias entre suelos H y NH para tres sustratos en ZAV (L-asparagina, sarcosina y D-manosa, Figura 3A) y para dos sustratos en DOR (D-glucosa y acetato, Figura 3B). No se observaron diferencias significativas para ninguno de los sustratos en BUR (Figura 3C).

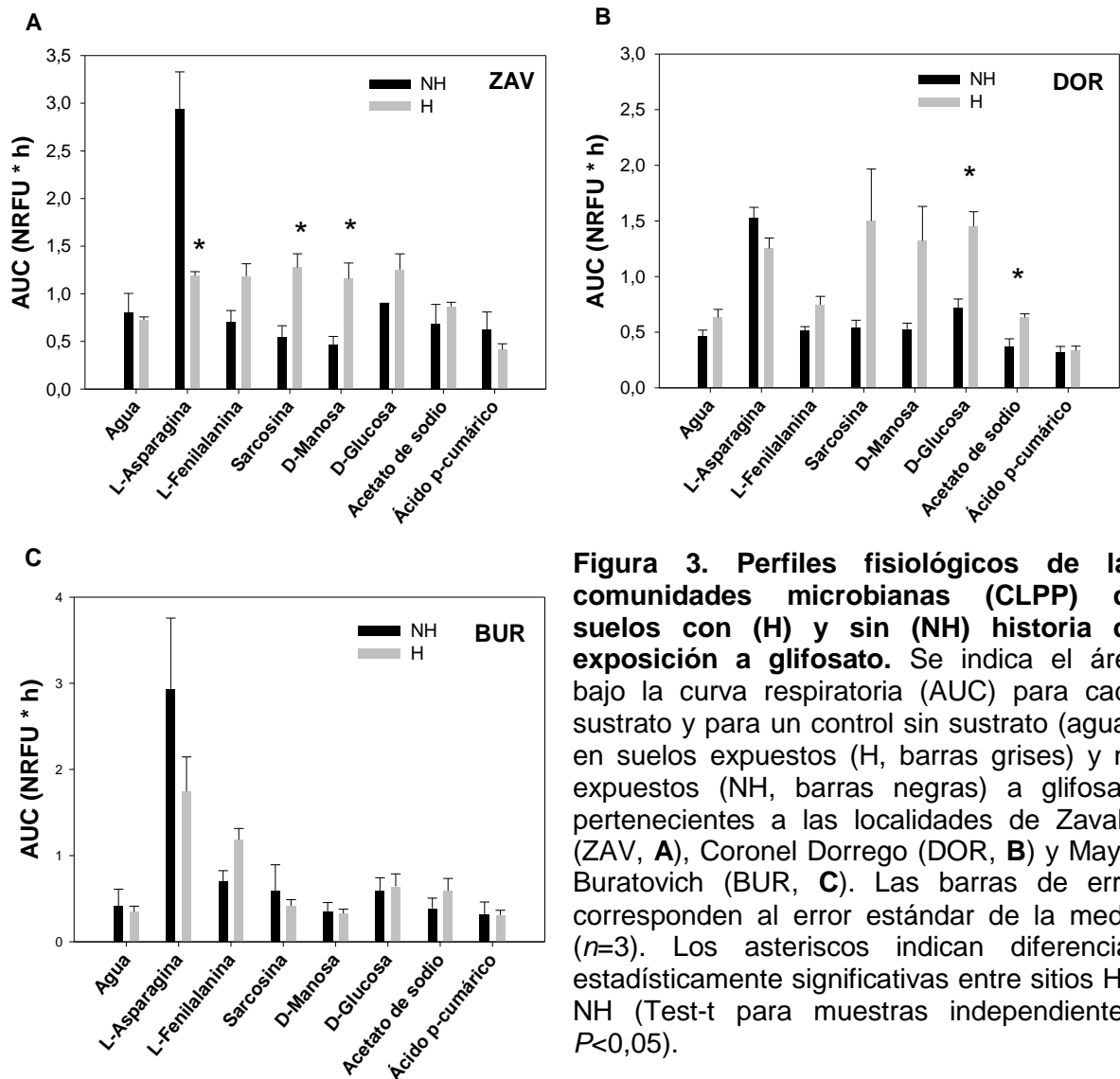


Figura 3. Perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas (CLPP) de suelos con (H) y sin (NH) historia de exposición a glifosato. Se indica el área bajo la curva respiratoria (AUC) para cada sustrato y para un control sin sustrato (agua), en suelos expuestos (H, barras grises) y no expuestos (NH, barras negras) a glifosato pertenecientes a las localidades de Zavalla (ZAV, **A**), Coronel Dorrego (DOR, **B**) y Mayor Buratovich (BUR, **C**). Las barras de error corresponden al error estándar de la media ($n=3$). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre sitios H y NH (Test-t para muestras independientes, $P<0,05$).

El AUC con L-asparagina como sustrato fue un 60% menor para ZAV_H comparado con ZAV_{NH}; en cambio, con sarcosina y D-manosa fue un 57 y un 60% mayor, respectivamente. Para DOR, la respuesta con glucosa fue un 50% menor en DOR_{NH} en relación al suelo con

CAPÍTULO 1

historia. De manera similar a la respiración de D-glucosa, se observó una respuesta un 42% más baja con acetato de sodio como sustrato.

En el caso de los RQ, se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre ZAV_{NH} y ZAV_H con tres aminoácidos (L-asparagina, L-fenilalanina y sarcosina, Figura 2A) y con D-manosa. En DOR y BUR, sólo L-asparagina mostró diferencias significativas entre H y NH, como se observa en las Figuras 4B y 4C, respectivamente.

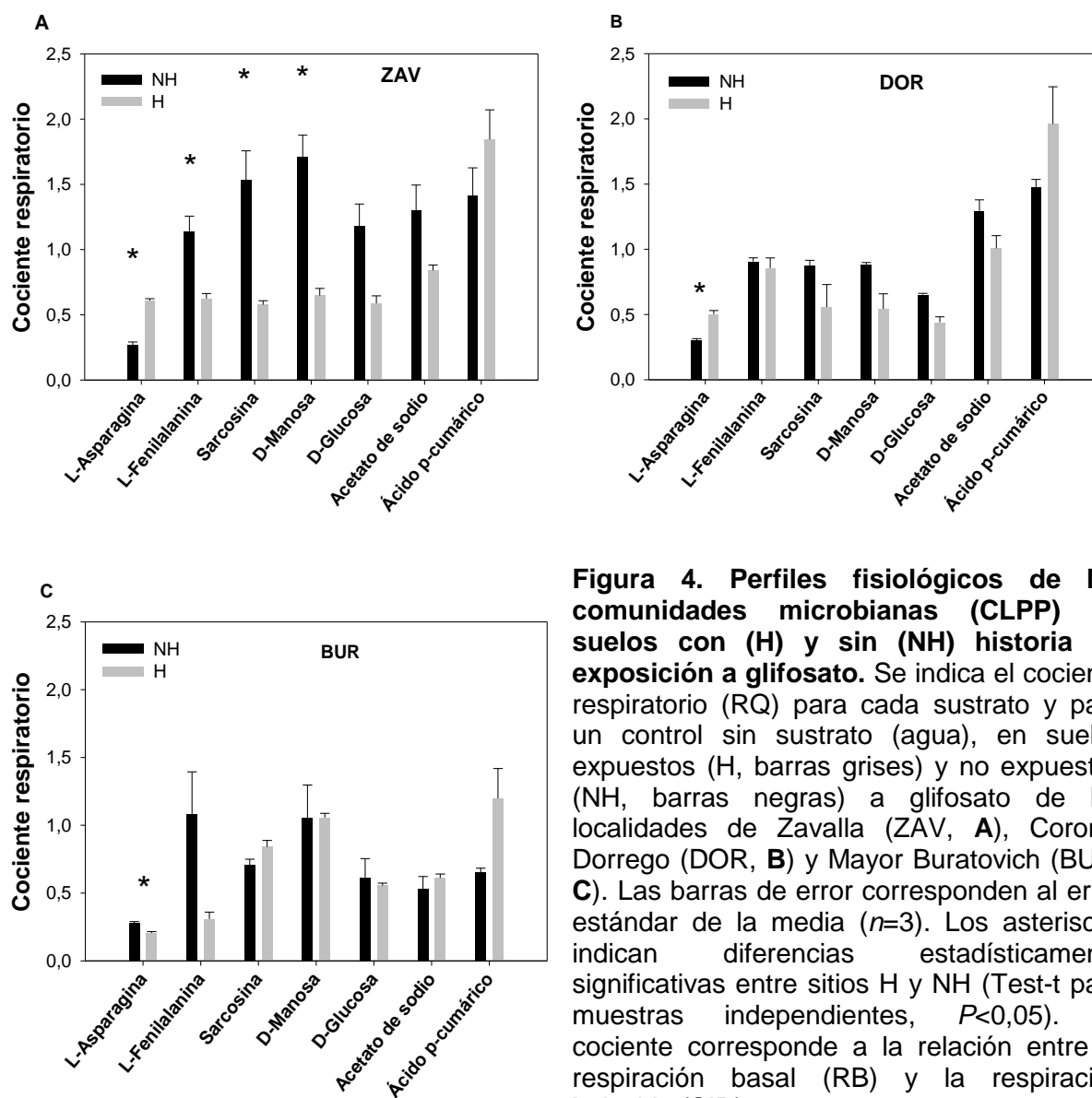


Figura 4. Perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas (CLPP) de suelos con (H) y sin (NH) historia de exposición a glifosato. Se indica el cociente respiratorio (RQ) para cada sustrato y para un control sin sustrato (agua), en suelos expuestos (H, barras grises) y no expuestos (NH, barras negras) a glifosato de las localidades de Zavalla (ZAV, **A**), Coronel Dorrego (DOR, **B**) y Mayor Buratovich (BUR, **C**). Las barras de error corresponden al error estándar de la media ($n=3$). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre sitios H y NH (Test-t para muestras independientes, $P<0,05$). El cociente corresponde a la relación entre la respiración basal (RB) y la respiración inducida (SIR).

El cálculo y posterior análisis de parámetro E , considerando los siete sustratos evaluados, indicó que no existen diferencias significativas en la equitatividad entre suelos H y NH para ZAV y BUR. En cambio, para DOR este parámetro resultó leve pero significativamente menor (un 15% menor) en el sitio H respecto del sitio NH (Figura 5).

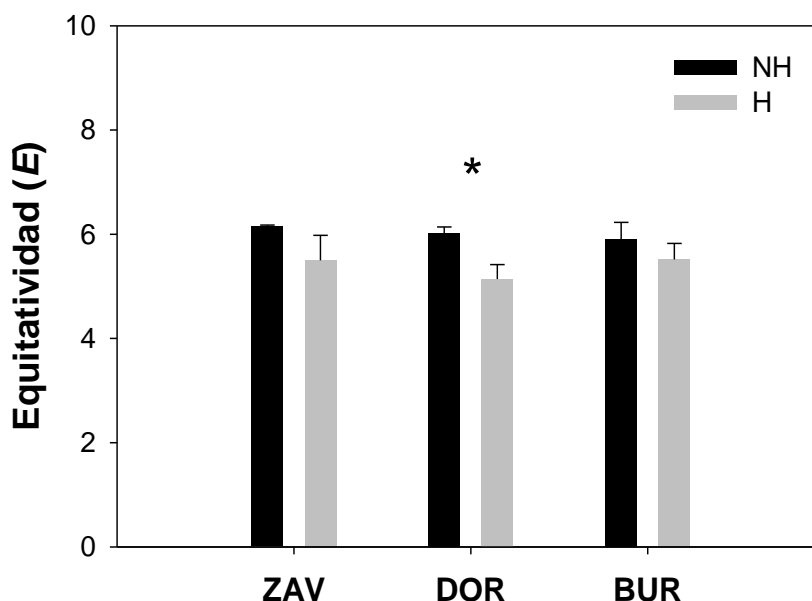


Figura 5. Equitatividad de uso de sustratos (*E*). Se indican las medias correspondientes a cada uno de los sitios con (H) y sin (NH) historia de exposición a glifosato en Zavalla (ZAV), Coronel Dorrego (DOR) y Mayor Buratovich (BUR). Las barras de error corresponden al error estándar de la media ($n=3$). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre sitios H y NH (Test-t para muestras independientes, $P<0,05$).

5.2 PCR cuantitativa (qPCR) y perfiles de DGGE de bacterias totales

Las diferencias de abundancia de bacterias totales entre los suelos H y NH se analizaron mediante qPCR del gen codificante para el ARNr 16S. El número de copias de este gen fue considerado sólo como una estimación de la abundancia bacteriana. En cambio, no se realizaron intentos de conversión de copias a número de células para evitar la introducción de errores, principalmente debido a la incerteza en el número de operones de cada una de las especies presentes en comunidades microbianas (variable entre diferentes grupos bacterianos).

La ecuación que describe la relación entre los valores de C_t y el número de copias del gen del ARNr 16S, correspondiente a la regresión lineal de la curva estándar, fue la siguiente: $C_t = 39,57 - 3,63 \log_{10} (n^\circ \text{ copias})$ ($R^2=0,99$; Eficiencia=88,55%). No se detectaron diferencias significativas ($P>0,05$) entre sitios H y NH en ninguna de las tres localidades (ZAV, DOR y BUR) (Figura 6).

El análisis del gel obtenido mediante PCR-DGGE para la comunidad bacteriana indicó una alta similitud (valores cercanos al 90%) entre los perfiles correspondientes a sitios H y NH, tal como lo indica el dendrograma de la Figura 7. Se observa claramente que las dos réplicas correspondientes al suelo NH no forman un *cluster* separado de las réplicas correspondientes al suelo H. Este resultado se observó tanto en ZAV como en BUR.

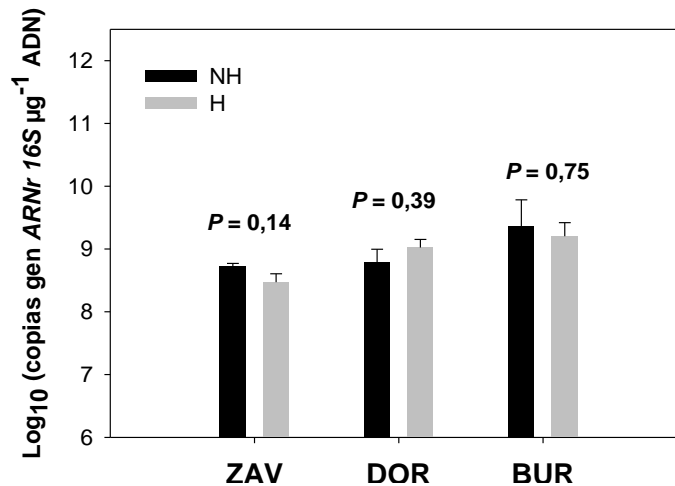


Figura 6. Número de copias del gen codificante para el ARNr 16S (*Eubacteria*) en sitios con (H) y sin (NH) historia de exposición a glifosato en Coronel Dorrego (DOR), Zavalla (ZAV) y Mayor Buratovich (BUR). Se indica el número de copias μg^{-1} de ADN expresado en forma logarítmica (\log_{10} copias μg^{-1} de ADN) para cada una de las tres localidades. Las barras de error corresponden al error estándar de la media ($n=3$). Se indican también los valores de probabilidad asociada correspondientes al test-t para muestras independientes.

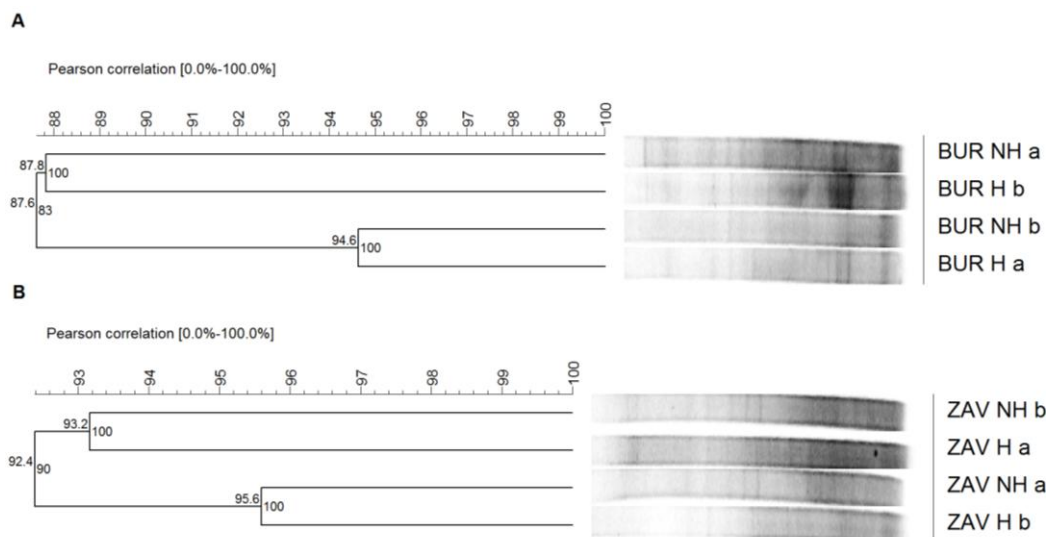


Figura 7. Análisis de perfiles electroforéticos de comunidades bacterianas de suelos con (H) y sin (NH) historia de exposición a glifosato. Los perfiles se obtuvieron mediante amplificación del gen del ARNr 16S y posterior separación en gel de poliacrilamida con gradiente de desnaturizante (PCR-DGGE). Los dendrogramas corresponden al análisis basado en los perfiles densitométricos de ZAV (A) y BUR (B) utilizando el coeficiente de correlación producto-momento de Pearson (r) y el algoritmo de agrupamiento UPGMA. Las letras en minúscula en el rótulo de cada una de las muestras indican las réplicas (a-b). En cada nodo, el número izquierdo indica el valor de similitud ($r \times 100$), mientras que el número derecho corresponde al coeficiente de correlación cofenética.

5.3 Ensayo PICT (ingrediente activo)

Como se observa en la Figura 8, la curva dosis-respuesta en el caso de ZAV_{NH} muestra una tendencia de tipo bifásica. Este comportamiento, caracterizado por una primera

estimulación a dosis bajas, seguido de una disminución en el IR, no se detectó en el suelo de ZAV_H.

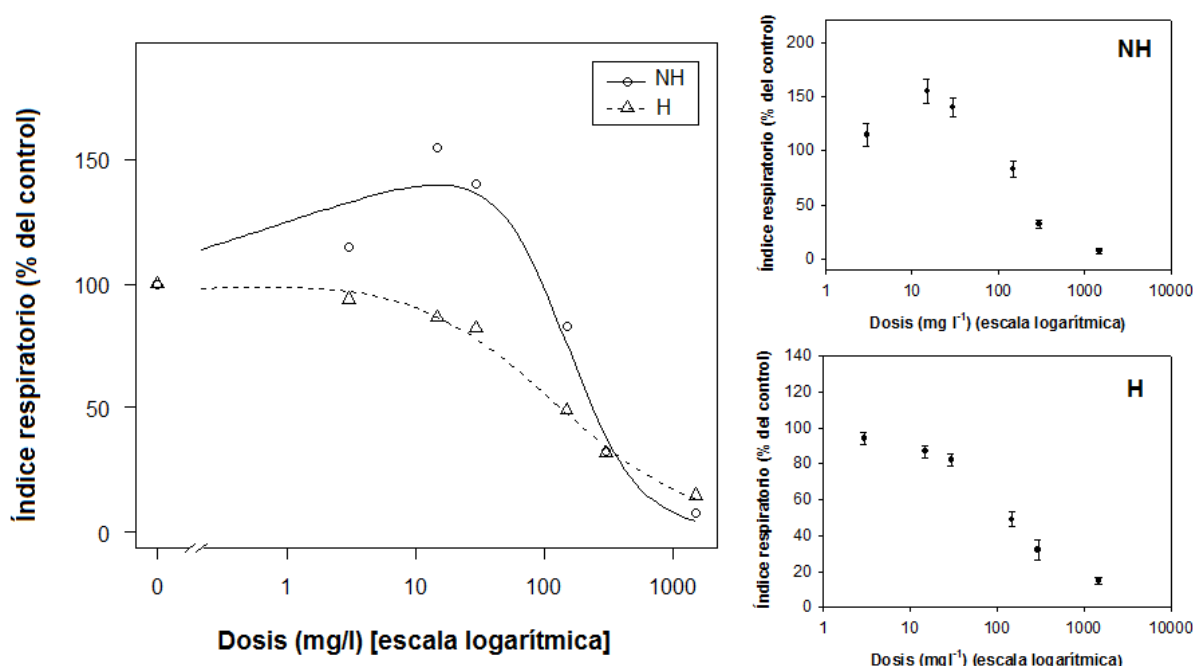


Figura 8. Curvas dosis-respuesta (glifosato como ingrediente activo) en suelos con (H) y sin (NH) historia de exposición a glifosato de la localidad de Zavalla. Se encuentra graficado el índice respiratorio (IR) para dosis crecientes (escala logarítmica). Las dosis corresponden a la concentración final (mg l^{-1}) del IA en los pocillos de la placa sensora BDOBS. Las barras de error (error estándar de la media) se encuentran indicadas en gráficos separados para facilitar la visualización de las respuestas.

El modelo Cedergreen-Ritz-Streibig (CRS) (Anexo I) resultó adecuado para describir el comportamiento a dosis crecientes del IA observado en la Figura 8, tal como lo indica el análisis estadístico de la Tabla 5 (*lack-of-fit test*, $P > 0,05$). Una vez realizado el ajuste, se estimó el IS, basado en la relación entre los valores estimados de IC₅₀ de los sitios H y NH. El resultado indicó que el IS es significativamente distinto de 1 ($P < 0,05$), con un valor de IC₅₀ del sitio con historia (IC_{50_H}) 40% menor que el del sitio sin historia (IC_{50_{NH}}) (Tabla 6).

Tabla 5. Modelos de ajuste de curvas dosis-respuesta para el ingrediente activo. Se indican los modelos utilizados en Zavalla (ZAV), Coronel Dorrego (DOR) y Mayor Buratovich (BUR). Se indican también los valores de probabilidad asociada (*P-value*) correspondientes al test estadístico. CRS: Cedergreen–Ritz–Streibig; BC: Brain-Cousens.

Lack-of-fit test (curvas dosis-respuesta: ingrediente activo)		
Localidad	Modelo de ajuste	P-value
ZAV	CRS	0,17
DOR	CRS	0,53
BUR	BC	0,64

CAPÍTULO 1

Tabla 6. Valores de concentración inhibitoria media máxima (IC50) e índices de selectividad (IS) para el ingrediente activo (IA) en suelos con (H) y sin (NH) historia de exposición a glifosato. Se indican los resultados para Zavalla (ZAV), Coronel Dorrego (DOR) y Mayor Buratovich (BUR). Las unidades corresponden a mg l^{-1} . El error estándar de la media se indica entre paréntesis. Valores de $P < 0,05$ indican que el IS es significativamente distinto de 1.

Ingrediente activo (IA)				
Localidad	IC50 _H	IC50 _{NH}	IS	P-value
ZAV	149,5 (37,2)	247,9 (25,6)	0,60 (0,14)	0,0062
DOR	159,1 (23,5)	140,7 (25,9)	1,13 (0,24)	0,59
BUR	80,1 (17,7)	106,24 (23,6)	0,75 (0,19)	0,21

Los sitios DOR_H y DOR_{NH} se comportaron de manera similar entre sí en respuesta a dosis crecientes del IA (Figura 9). El ajuste CRS resultó adecuado también en este caso para describir la respuesta (*lack-of-fit test*, $P > 0,05$, Tabla 5). Para estos suelos, no se observó un IS significativamente distinto de 1, tal como se indica en la Tabla 6 ($P > 0,05$).

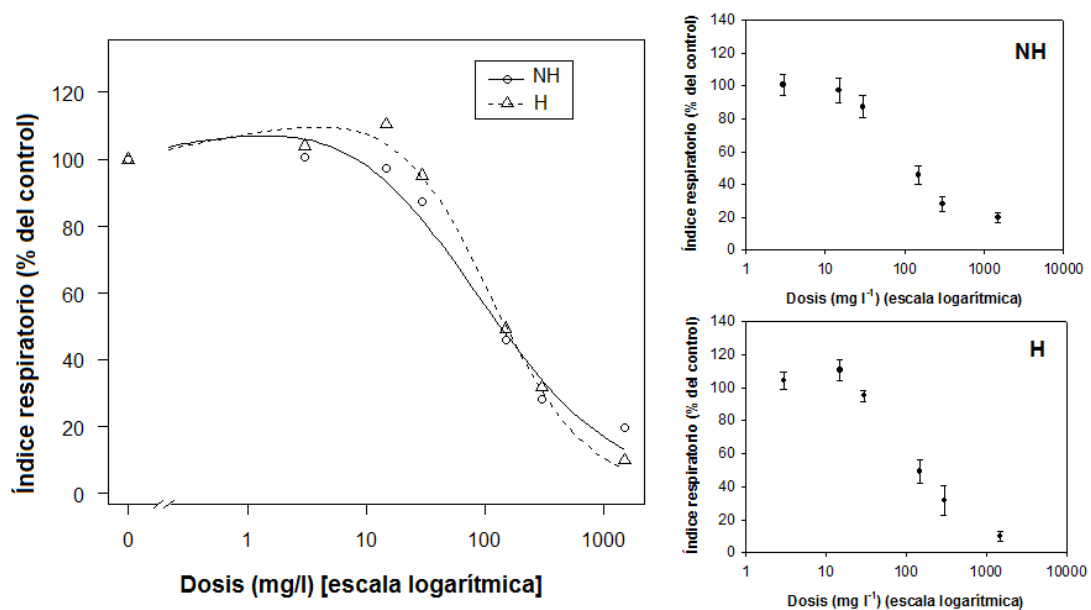


Figura 9. Curvas dosis-respuesta (glifosato como ingrediente activo) en suelos con (H) y sin (NH) historia de exposición a glifosato de la localidad de Coronel Dorrego. Se encuentra graficado el índice respiratorio (IR) para dosis crecientes (escala logarítmica). Las dosis corresponden a la concentración final (mg l^{-1}) del IA en los pocillos de la placa sensora BDOBS. Las barras de error (error estándar de la media) se encuentran indicadas en gráficos separados para facilitar la visualización de las respuestas.

El efecto de estimulación inicial a dosis bajas observado en ZAV (Figura 6) también se presentó en BUR_H y BUR_{NH} (Figura 10). En este caso, al igual que en DOR, tampoco se observó un IS significativamente distinto de 1 (Tabla 6). El modelo más apropiado para el ajuste de las curvas dosis-respuesta (*lack-of-fit test*, $P > 0,05$, Tabla 5) fue el modelo Bray-Cousens (BC) (Anexo I).

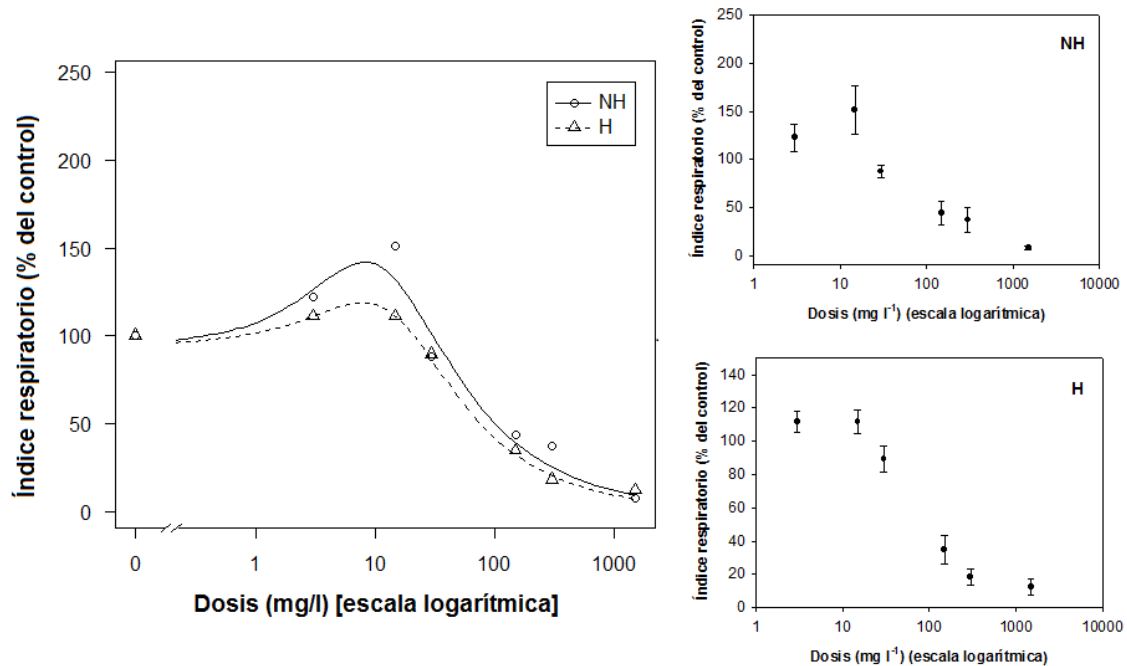


Figura 10. Curvas dosis-respuesta (glifosato como ingrediente activo) en suelos con (H) y sin (NH) historia de exposición a glifosato de la localidad de Mayor Buratovich. Se encuentra graficado el índice respiratorio (IR) para dosis crecientes (escala logarítmica). Las dosis corresponden a la concentración final (mg l^{-1}) del IA en los pocillos de la placa sensora BDOBS. Las barras de error (error estándar de la media) se encuentran indicadas en gráficos separados para facilitar la visualización de las respuestas.

5.4 Ensayo PICT (formulado comercial)

Se observaron efectos de estimulación en las curvas dosis-respuesta de ZAV a dosis bajas del FC, seguido de una disminución del IR a dosis más altas. En este caso, se utilizó el modelo Gaussiano para el ajuste de las curvas (*lack-of-fit test*, $P > 0,05$; Tabla 7). Si se compara con la respuesta al IA, en este caso la estimulación a dosis bajas se observó no sólo en el sitio NH sino también en el sitio H (Figura 11). Más aún, la estimulación se presentó a dosis más altas con el FC que con el IA. La estimación del índice IS indicó que la potencia relativa del FC ($\text{IC}_{50\text{H}}/\text{IC}_{50\text{NH}}$) no es significativamente distinta de 1 ($P > 0,05$, Tabla 8).

Tabla 7. Modelos de ajuste de curvas dosis-respuesta para el formulado comercial. Se indican los modelos utilizados en Zavalla (ZAV) y Coronel Dorrego (DOR). Se indican también los valores de probabilidad asociada (P -value) correspondientes al test estadístico. GAU: Gaussiano; CRS: Cedergreen–Ritz–Streibig.

Lack-of-fit test (curvas dosis-respuesta: formulado comercial)		
Localidad	Modelo de ajuste	P -value
ZAV	GAU	0,88
DOR	CRS	0,93

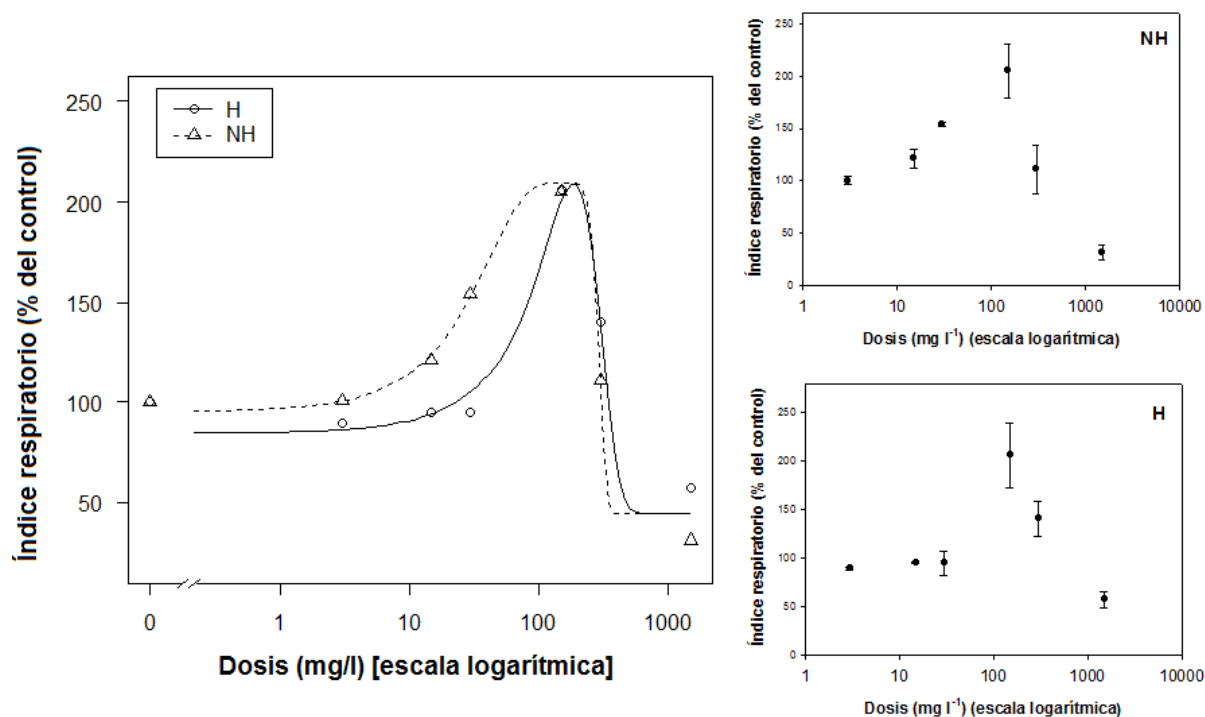


Figura 11. Curvas dosis-respuesta (glifosato como formulado comercial) en suelos con (H) y sin (NH) historia de exposición a glifosato de la localidad de Zavalla. Se encuentra graficado el índice respiratorio (IR) para dosis crecientes (escala logarítmica). Las dosis corresponden a la concentración final del IA (mg l^{-1}) en los pocillos de la placa sensora BDOBS. Las barras de error (error estándar de la media) se encuentran indicadas en gráficos separados para facilitar la visualización de las respuestas.

Tabla 8. Valores de concentración inhibitoria media máxima (IC50) e índices de selectividad (IS) para suelos con (H) y sin (NH) historia de exposición a glifosato de Zavalla (ZAV) y Coronel Dorrego (DOR). Las unidades corresponden a mg l^{-1} . El error estándar de la media se indica entre paréntesis. Valores de $P < 0,05$ indican que el IS es significativamente distinto de 1.

Formulado comercial (FC)				
Localidad	IC50 _H	IC50 _{NH}	IS	P-value
ZAV	335,8 (24,2)	299,9 (10,0)	1,12 (0,081)	0,15
DOR	943,7 (288,4)	644,6 (165,5)	1,46 (0,58)	0,43

Para los suelos de DOR, se obtuvieron curvas similares entre sí a dosis crecientes del FC (Figura 12), ajustadas adecuadamente con el modelo CRS (*lack-of-fit test*, $P > 0,05$; Tabla 5). Al igual que en los ensayos PICT mencionados anteriormente, los valores de IC50 de los suelos H y NH no mostraron diferencias estadísticamente significativas, tal como lo indica el IS y su correspondiente valor de probabilidad asociada ($P > 0,05$, Tabla 8).

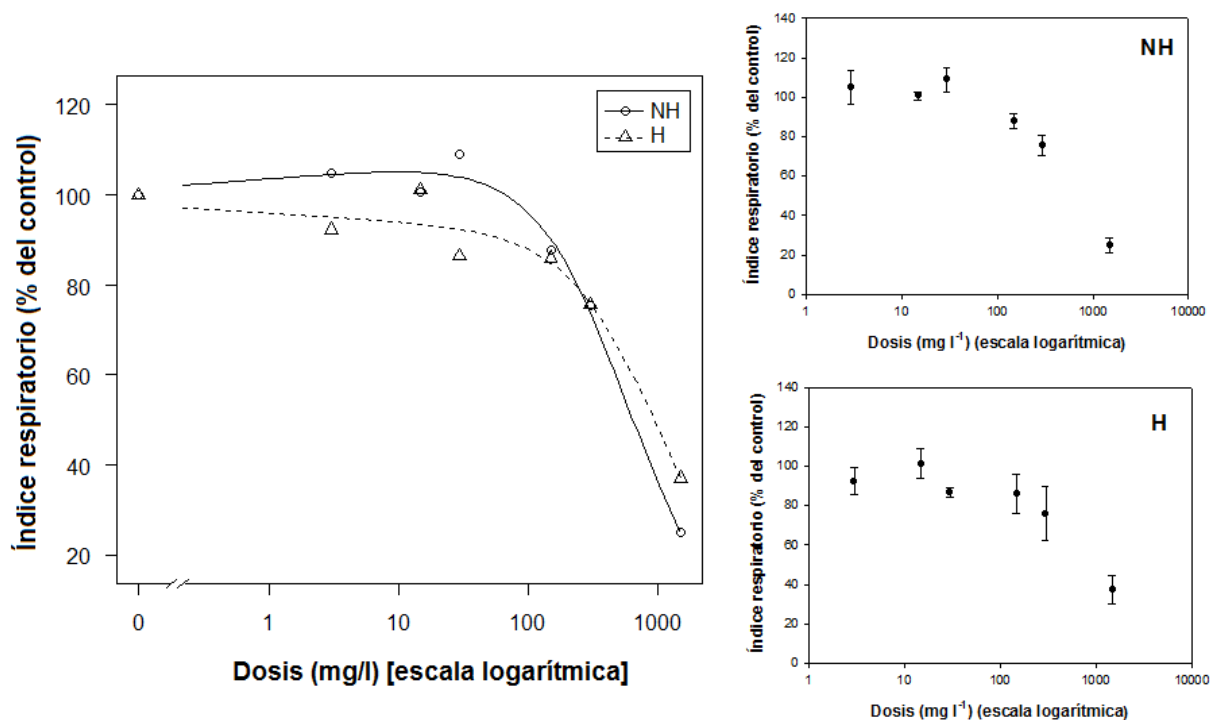


Figura 12. Curvas dosis-respuesta (glifosato como formulado comercial) en suelos con (H) y sin (NH) historia de exposición a glifosato de la localidad de Coronel Dorrego. Se encuentra graficado el índice respiratorio para dosis crecientes (escala logarítmica). Las dosis corresponden a la concentración final (mg l⁻¹) del IA en los pocillos de la placa sensora BDOBS. Las barras de error (error estándar de la media) se encuentran indicadas en gráficos separados para facilitar la visualización de las respuestas.

6. Discusión

El presente estudio abordó por primera vez el análisis comparativo de la respuesta de comunidades microbianas a dosis crecientes de glifosato (tanto IA como FC) entre sitios con (H) y sin (NH) historia del herbicida, con el objetivo de determinar si existe una respuesta de tolerancia de la comunidad inducida por este compuesto. Previamente, los suelos H y NH fueron caracterizados en cuanto a la estructura y función (perfiles catabólicos) de las comunidades microbianas, un procedimiento importante para complementar los resultados obtenidos mediante la estrategia PICT, tal como se discutirá a continuación.

En primer instancia, debe destacarse que aquellas diferencias detectadas en la respiración de ciertos compuestos carbonados entre suelos H y NH (Figura 3 y 4) o en el parámetro *E* (Figura 5), podrían resultar del efecto de diferentes factores no relacionados directamente con la historia de exposición a glifosato, debido a diferencias inherentes al manejo de los suelos: un suelo bajo agricultura intensiva (H) y otro sin ningún tipo de manejo agronómico (NH). Como se mencionó en las secciones 1 y 4 de este capítulo, en muchos estudios observacionales suele presentarse la situación particular en la que un sitio control

con idénticas características al sitio expuesto (excepto la exposición al contaminante) no se encuentra disponible y por este motivo los sitios “control” muestreados no son designados como tal sino como sitios de referencia (Smith *et al.*, 1993) o sin historia de exposición. Esta dificultad se presenta particularmente en el caso de glifosato dado el uso extendido del mismo, lo cual dificulta la disponibilidad de sitios agrícolas control en los cuales no ha existido ningún tipo de exposición previa y que puedan ser comparados con un suelo agrícola idéntico pero crónicamente expuesto al herbicida. Por lo tanto, las comparaciones realizadas en este estudio sólo reflejan en qué medida difieren los sitios H y NH en sus perfiles catabólicos pero no es posible asignar a la historia de exposición a glifosato como causal de las diferencias específicas observadas (Figuras 3, 4 y 5). No obstante, la caracterización fisiológica de los suelos H y NH es una aproximación importante previa al ensayo PICT dado que grandes diferencias en la equitatividad de uso de sustratos (parámetro *E*) podrían reflejar, por ejemplo, diferencias en la diversidad catabólica de las comunidades y a su vez una reducción de la diversidad catabólica puede relacionarse con una menor tolerancia a estreses o perturbaciones (Degens *et al.*, 2001), entre ellas, la tolerancia a glifosato (IA o FC). De manera similar, la comparación de comunidades microbianas de sitios H y NH, mediante qPCR y DGGE, permitió determinar si los suelos diferían o no en la estructura de la comunidad bacteriana, pero no hubiese sido posible asignar causalidad a la historia de la exposición a glifosato en caso de haberse observado diferencias en estos indicadores.

El análisis fisiológico de sitios H y NH de ZAV indicó que los perfiles correspondientes a estos suelos fueron los más contrastantes en términos del número de sustratos que mostraron diferencias (Figuras 3 y 4). Sin embargo, al calcular la equitatividad (*E*), un parámetro que integra la respuesta de todos los sustratos, no se observaron diferencias significativas entre sitios H y NH (ZAV y BUR, Figura 5) o bien se detectó una reducción significativa pero pequeña en el sitio H respecto del NH (DOR, Figura 5). El parámetro *E* es considerado un indicador de susceptibilidad de las comunidades microbianas a estreses o disturbios (Degens *et al.*, 2001). Las diferencias en el parámetro *E* entre sitios H y NH podrían reflejar diferencias en la diversidad funcional de las comunidades microbianas, la cual a su vez es importante para una mayor tolerancia a factores de estrés (Degens *et al.*, 2001), como la exposición crónica a glifosato. De esta manera, la observación de diferencias no significativas en la equitatividad (ZAV y BUR), o bien una diferencia significativa pero pequeña (como se observó en DOR), es consistente con la detección de una tolerancia no incrementada a glifosato en el sitio H respecto del sitio NH (Tablas 6 y 8).

Contrariamente a lo que podría ocurrir con los perfiles fisiológicos o con la estructura de la comunidad bacteriana (qPCR y PCR-DGGE), donde cualquier diferencia observada no podría ser explicada únicamente en base a la historia de exposición al herbicida, la tolerancia de las comunidades a un contaminante específico en un experimento PICT es un parámetro menos sensible a la variabilidad ambiental natural de los sitios comparados que otras medidas, y las diferencias suelen ser, frecuentemente, el resultado directo de la exposición al contaminante (Siciliano y Roy, 1999; Clements y Rohr, 2009; Zabaloy *et al.*, 2010). La selección de sitios de referencia y sitios contaminados idénticos (excepto en la historia de exposición a glifosato de cada uno ellos) no es tan crítica en un estudio PICT como sí podría serlo para otras comparaciones. La respuesta PICT no es tan sensible a diferencias relacionadas con el tipo de suelo (Gong *et al.*, 2000) y las propiedades fisicoquímicas (Siciliano y Roy, 1999). Más aún, la comparación de los suelos H y NH mediante qPCR indica que no existen diferencias significativas en la abundancia bacteriana (Figura 6), mientras que los perfiles PCR-DGGE indican una alta similitud (Figura 7). Por lo tanto, estas similitudes junto con la consideración mencionada anteriormente apoyan la selección de los sitios H y NH para estudio PICT, aun cuando el sitio NH no represente estrictamente un control respecto del sitio H.

De acuerdo con la revisión de la literatura, este trabajo constituye el primer estudio destinado a evaluar la presencia/ausencia de una respuesta de tolerancia de la comunidad inducida por glifosato, tanto como IA o como FC. Los resultados indicaron que la tolerancia a glifosato (IA o FC) no es consistente con la historia previa de exposición dado que los suelos con historia (H) no mostraron mayor tolerancia al herbicida que los correspondientes suelos de referencia sin historia (NH). Estos resultados son particularmente interesantes en el caso de ZAV y DOR considerando la larga historia de aplicación del herbicida, y contrastan con otros estudios que han reportado diferencias en la tolerancia utilizando la estrategia PICT, incluyendo químicos como fenol, 2,4-D y 2,4,6 trinitrotolueno (Gong *et al.*, 2000; Demoling y Bååth, 2008; Zabaloy *et al.*, 2010). El resultado negativo del ensayo PICT, es decir, la ausencia de una mayor tolerancia en los sitios H respecto de los NH, podría explicarse por la adsorción de glifosato al suelo, fenómeno que reduce notablemente su biodisponibilidad y por lo tanto, la exposición de las comunidades microbianas al mismo (Zabaloy *et al.*, 2011; Duke *et al.*, 2012). De acuerdo con Haney *et al.* (2000), la concentración de glifosato esperada luego de una aplicación a la dosis recomendada a campo en suelos de alta adsorptividad (2 mm de interacción) es de alrededor de 50 mg kg⁻¹. Para una constante de adsorción de 50 l kg⁻¹, esto representa una concentración en la solución del suelo de 24 µM, capaz de inhibir a especies muy sensibles (Duke *et al.*, 2012) aunque varias veces menor a

CAPÍTULO 1

las concentraciones requeridas para una inhibición del crecimiento del 50% en diferentes especies estudiadas, como *Escherichia coli* y *Pseudomonas putida* (aproximadamente 3 mM y 2 mM respectivamente; Sihtmäe *et al.*, 2013); o *Bradyrhizobium japonicum* (aproximadamente 1 mM) (Moorman *et al.*, 1982). Simultáneamente, el tiempo de vida relativamente corto del glifosato en el suelo, desde unos pocos días hasta alrededor de 240 días (Giesy *et al.*, 2000; Vereecken, 2005), por la degradación biótica, podría atenuar sus efectos. En función de los resultados obtenidos, es posible suponer que la degradación en el suelo ha tenido lugar, pero debido a las bajas concentraciones en la solución del suelo (producto de la adsorción) y a la naturaleza cometabólica de la degradación, no ha sido suficiente por sí misma para actuar como un factor de selección y producir un incremento significativo en la abundancia de las poblaciones microbianas degradadoras por sobre las no degradadoras durante el período de exposición. Este escenario es sólo uno de los posibles escenarios que podrían explicar el resultado PICT negativo observado. En la Discusión Final de la Tesis se abordarán otras posibles explicaciones al respecto.

Otro aspecto a destacar es la observación de efectos estimulatorios tempranos (a bajas dosis) en la curvas dosis-respuesta. La detección de este fenómeno, denominado “hormesis” en toxicología, es un resultado novedoso para comunidades microbianas del suelo expuestas a glifosato. La hormesis ha sido ampliamente descrita en distintas publicaciones (Calabrese, 2005, 2009; Duke *et al.*, 2006), y en el caso de glifosato se ha observado tanto en plantas (Cedergreen, 2008) como así también en cultivos axénicos de microorganismos expuestos a formulados comerciales del herbicida (Qiu *et al.*, 2013; Nweke *et al.*, 2014). Sin embargo, de acuerdo con la revisión de la literatura, no se han hallado reportes en comunidades microbianas del suelo y menos aún, no ha sido descrita en evaluaciones que consideren tanto al IA como al FC. Una posible explicación del fenómeno de hormesis observado podría estar relacionada con el incremento de la respuesta respiratoria a bajas dosis debido al catabolismo de la sarcosina (un producto derivado de la degradación del glifosato), el cual actuaría como sustrato para la respiración junto con el ácido *p*-cumárico originalmente añadido a la placa. Esta estimulación también podría ser el reflejo de una respuesta de estrés metabólico a bajas dosis (subletales) debido al drenaje energético resultante del ATP utilizado en la acumulación de shikimate y otros ácidos hidroxibenzoicos (Zablotowicz y Reddy, 2004; Zabaloy *et al.*, 2012).

Diferentes estudios han reportado la ecotoxicidad de formulados comerciales de glifosato como así también del IA. Sin embargo, se han centrado principalmente en microorganismos acuáticos y terrestres específicos (Qiu *et al.*, 2013; Sihtmäe *et al.*, 2013). El rango completo de sensibilidad para comunidades microbianas del suelo no se conoce completamente

(Duke *et al.*, 2012). Sihtmäe *et al.* (2013) reportaron valores de IC50 para cepas bacterianas expuestas al IA y a un FC (*Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* y *Bacillus mycoides*). Estos resultados se obtuvieron en base a medidas de inhibición del crecimiento microbiano en medios de cultivo y sobre microorganismos aislados, no sobre comunidades microbianas, lo cual imposibilita la comparación directa con los resultados presentados en las Tablas 6 y 8. De acuerdo con la revisión de la literatura, no se han informado hasta el momento valores de IC50 obtenidos a partir de mediciones de respuesta de toda la comunidad microbiana en suspensiones de muestras de suelo (con y sin historia de glifosato).

7. Conclusiones

En este estudio se reportan por primera vez los resultados de un ensayo cuyo objetivo fue evaluar la presencia/ausencia de un fenómeno de tolerancia de la comunidad inducida por glifosato (PICT) en comunidades microbianas del suelo. Al mismo tiempo se presentan evidencias de respuestas de hormesis en comunidades expuestas al herbicida.

Los resultados del ensayo PICT indican que la tolerancia de las comunidades microbianas a glifosato (tanto IA como FC) no es consistente con la historia previa de exposición al herbicida en las tres localidades analizadas: los sitios con larga historia de glifosato (H) no presentaron valores mayores de IC50 respecto de los sitios sin historia (NH). Por lo tanto, las evidencias obtenidas hasta el momento sugieren la ausencia de una respuesta PICT frente a glifosato en los sitios estudiados, contrariamente a la hipótesis propuesta. Sin embargo, ello no debe ser considerado como condición de suficiencia para concluir la ausencia de modificaciones en la estructura y/o función de la comunidad microbiana. Como se comentó en la Introducción General de esta Tesis, para una evaluación abarcativa del impacto sobre la microbiota no sólo se requiere de indicadores de tipo funcionales (como el utilizado en la estrategia PICT) sino también aquellos relacionados con la estructura de la comunidad y que apunten a grupos microbianos específicos potencialmente afectados por el herbicida, particularmente frente a aplicaciones repetidas. El Capítulo 2 se enfocará justamente en estos aspectos, los cuales serán retomados en la Discusión Final.

Finalmente, los resultados de este estudio deberán complementarse con una evaluación de “costo de tolerancia”, donde se determine si la aplicación de glifosato influye o no en la sensibilidad a un disturbio secundario. La ausencia de respuesta PICT implicaría que no existe un costo asociado derivado de un incremento en la tolerancia, aspecto que se abordará detalladamente en el Capítulo 3.

CAPÍTULO 2

IMPACTO DE APLICACIONES REPETIDAS DE GLIFOSATO EN COMUNIDADES MICROBIANAS DE SUELOS CON Y SIN HISTORIA DEL HERBICIDA

Allegrini, M., Gómez, E., Zabaloy, M.C. (2016). *Repeated glyphosate exposure induces shifts in nitrifying communities and metabolism of phenylpropanoids. Soil Biology and Biochemistry* 533, 60-68.

1. Introducción

Como se mencionó en la Introducción General, numerosos estudios han abordado los efectos ambientales de aplicaciones únicas de glifosato. Se han reportado efectos mínimos o ausencia de efectos en la estructura y función de la comunidad microbiana tanto en suelos forestales (Busse *et al.*, 2001; Ratcliff *et al.*, 2006) como en suelos agrícolas (Weaver *et al.*, 2007), cuando el herbicida es aplicado en las dosis recomendadas a campo, y efectos transientes a dosis mayores. Sin embargo, la información relacionada con el impacto de aplicaciones repetidas es considerablemente menor (Lancaster *et al.*, 2010). La incidencia creciente de malezas que han desarrollado tolerancia a glifosato ha conducido a un número cada vez mayor de aplicaciones como así también a dosis más elevadas y combinaciones con otros herbicidas como el 2,4-D (Duke *et al.*, 2012; Papa *et al.*, 2012; Zabaloy *et al.*, 2016a).

Algunos estudios han reportado un mayor impacto de aplicaciones repetidas de pesticidas respecto a una sola aplicación (Kulshrestha *et al.*, 2000; Zablotowicz *et al.*, 2007). Para el herbicida glifosato, en particular, los efectos de aplicaciones repetidas han sido investigados a diferentes niveles. En estudios a campo, Busse *et al.* (2001) no encontraron diferencias en la respiración microbiana ni en bacterias totales como así tampoco en la biomasa microbiana ni en el qCO_2 , y sólo efectos mínimos en la diversidad catabólica de bacterias cultivables, cuando se compararon suelos control (25-100% cobertura del sotobosque) respecto de suelos forestales que recibieron glifosato para el control de la vegetación del sotobosque (durante 9 a 13 años). A nivel de microcosmos, ciertos estudios indican que tanto la estructura de la comunidad microbiana como la actividad son afectadas por aplicaciones repetidas de formulados comerciales (de Andrea *et al.*, 2003; Lancaster *et al.*, 2010). Se observó un incremento de metil ésteres de ácidos grasos fosfolipídicos (FAMES) pertenecientes a bacterias gram negativas luego de cinco aplicaciones en relación a una, dos, tres o cuatro aplicaciones. De manera similar, en el mismo estudio, se detectó un incremento en la abundancia de *Burkholderia* spp. mediante la construcción y secuenciación de bibliotecas de clones del gen que codifica para el ARNr 16S (Lancaster *et*

CAPÍTULO 2

al., 2010). Utilizando glifosato marcado con ^{14}C en el grupo fosfometilo, se observó una disminución en el porcentaje acumulado de ^{14}C mineralizado cuando el glifosato fue aplicado cuatro veces en relación a una única aplicación (de Andrea *et al.*, 2003) como así también luego de cuatro o cinco aplicaciones en relación a tres o menos (Lancaster *et al.*, 2010). De manera similar, la detección de residuos de ^{14}C incorporados en la biomasa microbiana fue mayor luego de cinco aplicaciones de glifosato que luego de la primer aplicación (Lancaster *et al.*, 2010). Sin embargo, todavía son necesarios más estudios para elucidar los efectos de aplicaciones repetidas en la microbiota, especialmente en aquellos microorganismos directamente involucrados en procesos de relevancia ecológica e incluyendo suelos con larga historia como también sin historia de aplicación de glifosato. Entre estos procesos, la nitrificación requiere de una especial atención considerando su rol fundamental en la transformación del N en el suelo (Kowalchuk y Stephen, 2001; Subbarao *et al.*, 2013). Como se mencionó en la Introducción General de la Tesis, los parámetros microbianos relacionados con la nitrificación han sido considerados en diferentes estudios y han mostrado sensibilidad a diversos pesticidas, incluyendo herbicidas (Hendricks y Rhodes, 1992; Hernández *et al.*, 2011; Feld *et al.*, 2015), fungicidas (Puglisi *et al.*, 2012), e hidrocarburos (Deni y Penninckx, 1999). Más aún, las modificaciones en el número y en la composición de especies de BOA y AOA, han sido postulados como indicadores *in-situ* de impacto biológico en la recuperación de ambientes contaminados (Kowalchuk y Stephen, 2001). En base a estas consideraciones, el estudio presentado a continuación evaluó el impacto de aplicaciones repetidas de glifosato a nivel molecular centrándose en BOA como indicadoras. Asimismo, a nivel fisiológico, se seleccionó como indicador un parámetro relacionado con otro grupo de relevancia ecológica: los microorganismos involucrados en la degradación de fenilpropanoides derivados de lignina. Específicamente se evaluó el parámetro RQ en presencia de ácido *p*-cumárico como sustrato, teniendo en cuenta las consideraciones mencionadas en la Sección 4.3 del Capítulo 1 respecto de la relevancia de este compuesto en el suelo como así también su relación con el modo de acción del herbicida.

Considerando la escasa información disponible respecto del comportamiento ambiental de los aditivos presentes en formulados comerciales (FC) del herbicida, se analizaron los efectos no sólo para el IA sino también para el FC. En el caso de glifosato, pocos estudios han incluido simultáneamente al IA y al FC en el análisis de impacto sobre microorganismos del suelo (Cedergreen y Streibig, 2005; Qiu *et al.*, 2013; Sihtmäe *et al.*, 2013). Como se mencionó en el Capítulo 1, varios autores han criticado la utilización de datos ecotoxicológicos basados únicamente en el IA. Se ha demostrado que los FC de pesticidas

exhiben una toxicidad diferente sobre organismos no blanco en relación a los correspondientes IAs debido a la presencia de diversos aditivos (Krogh *et al.*, 2003; Cedergreen y Streibig, 2005; Qiu *et al.*, 2013; Sihtmäe *et al.*, 2013). Entre ellos, las polioxietilenaminas (POEAs) continúan siendo utilizadas en diferentes formulaciones (Tush y Mesher, 2016). Sin embargo, otros aditivos contribuirían a la toxicidad del formulado. Sihtmäe *et al.* (2013) observaron que un FC sin POEAs mostraba mayor toxicidad sobre bacterias del suelo respecto del IA y de un FC con POEAs. En este capítulo se abordarán los efectos de aplicaciones repetidas tanto del IA como de un FC respecto de microcosmos control sin herbicida.

2. Objetivo específico

Evaluar el impacto de aplicaciones sucesivas de glifosato a nivel de microcosmos en comunidades microbianas de suelos con y sin historia del herbicida.

3. Hipótesis

Las aplicaciones repetidas de glifosato tendrán efectos sobre la respiración de la comunidad microbiana como así también en la estructura y abundancia de la comunidad de BOA.

Las predicciones correspondientes a esta hipótesis son: 1) Las respuestas de sitios H y NH serán diferentes entre sí debido a diferencias inherentes a las características de las comunidades microbianas de cada sitio 2) Se espera detectar diferentes efectos del FC respecto del IA considerando la toxicidad reportada para los aditivos comúnmente encontrados en los formulados comerciales 3) Las BOA resultarán particularmente sensibles a la acumulación de aplicaciones repetidas del herbicida considerando la reconocida sensibilidad a diversos pesticidas.

4. Materiales y métodos

4.1 Sitios de estudio y muestreo de suelos

El muestreo fue realizado en el año 2014 en las localidades de Mayor Buratovich ("BUR", Pcia. de Buenos Aires) y Zavalla ("ZAV", Pcia. de Santa Fe), en los mismos sitios con (H) y sin historia (NH) descriptos anteriormente en la Sección 4.1 del Capítulo 1. Para cada sitio con o sin historia se tomaron 15 sub-muestras (0-10 cm de profundidad) con pala corta de mano en un área de 350 m², las cuales fueron mezcladas homogéneamente para conformar una única muestra compuesta del sitio. La capa superior de materia orgánica (hojarasca) fue removida en el suelo forestal (ZAV) durante el muestreo. El suelo muestreado fue tamizado previo a la homogeneización (<5,6 mm). La muestra compuesta de cada sitio fue utilizada

inmediatamente para la preparación de los microcosmos. Las propiedades fisicoquímicas de los suelos muestreados se encuentran indicadas en la Tabla 3 del Capítulo 1.

4.2 Diseño experimental y preparación de microcosmos

Se realizó un ensayo de laboratorio de corta duración utilizando microcosmos. A partir de las muestras compuestas de suelo de cada sitio (H y NH) se prepararon 12 microcosmos (cuatro tratamientos x tres réplicas) a los cuales se les asignó aleatoriamente alguno de los siguientes tratamientos: sin aplicaciones (control), una, dos y tres aplicaciones del ingrediente activo (IA). De la misma manera, se repitió el procedimiento para el formulado comercial (FC). El período de tiempo entre cada una de las aplicaciones fue de 14 días, de manera similar a lo reportado por Lancaster *et al.* (2010).

La dosis de referencia empleada en cada aplicación fue de $49 \mu\text{g IA g}^{-1}$ suelo, de acuerdo a lo propuesto en otros estudios previos similares en microcosmos (Haney *et al.*, 2000; Ratcliff *et al.*, 2006; Lancaster *et al.*, 2010). Esta dosis ha sido calculada por Haney *et al.* (2000) en base a un suelo de tipo franco limoso con contenido de arena, limo y arcilla similar al mencionado anteriormente para los suelos de Zavalla. El cálculo de la misma está basado en una aplicación $1\times$ de la dosis recomendada a campo ($0,84 \text{ kg ha}^{-1}$) y una profundidad de interacción de sólo 2 mm debido a la alta adsorptividad y baja movilidad del glifosato (Haney *et al.*, 2000).

Tanto el IA como el FC fueron aplicados en un volumen final de 1 ml (en agua destilada estéril) mediante aspersión manual con un aspersor de 5 ml de capacidad desde la superficie de manera de cubrir toda la superficie del microcosmo. En el caso de los controles se aplicó sólo agua destilada estéril. Los microcosmos control como así también aquellos que recibieron aplicaciones de glifosato fueron ajustados siempre a un 60% de su capacidad de campo (Cc) con agua destilada estéril luego de cada tratamiento. En el caso del IA se utilizó la sal de potasio de N-(fosfonometil)glicina de grado analítico (99,7%, PestanalTM), mientras que en el caso del FC se utilizó el formulado Roundup Full II (IA: sal de potasio 66,2% P/V, MonsantoTM, aditivos no especificados debido a información confidencial).

Los microcosmos fueron preparados en viales de plástico estériles de 100 ml con tapa a rosca (colocadas a la mitad de su máximo ajuste para permitir la aireación) en los que se colocaron 20 g de suelo a un 50% de su capacidad de campo. Durante el experimento los microcosmos se incubaron en la oscuridad a $25\pm 1^\circ\text{C}$ en una incubadora Ingelab modelo I.501 PF. Antes de comenzar con el ensayo se realizó una pre-incubación de cinco días a la misma temperatura. Los microcosmos fueron muestreados a las 48 horas de la última aplicación. La fecha de inicio de la pre-incubación no fue la misma en todos los casos sino

que fue seleccionada de acuerdo al número de aplicaciones de cada tratamiento, de manera tal de muestrear todos los microcosmos al mismo tiempo (desfasaje de la fecha de inicio).

4.3 *Análisis de respiración de las comunidades microbianas*

Las medidas de respiración de la comunidad microbiana se llevaron a cabo a las 48 horas de la última aplicación utilizando el sistema de placas BDOBS descrito en la Sección 4.2 del Capítulo 1 (BD Oxygen Biosensor System[®], Wodnicka *et al.*, 2000). Se evaluó la respiración inducida por el sustrato (SIR) utilizando tres sustratos carbonados: L-fenilalanina, D-manosa y ácido *p*-cumárico (Sigma).

Las placas se prepararon utilizando una pipeta de repetición Minilab 201 (HTL LAB Solutions) cargando 100 µl de las soluciones madre de los correspondientes sustratos (150 mg l⁻¹) previamente esterilizadas por filtración utilizando filtros Sartorius Minisart 0,2 µm (concentración final de los sustratos: 50 mg l⁻¹). Asimismo se incluyó un control con la suspensión de suelo pero con agua destilada estéril en lugar de sustrato, de manera de determinar la RB.

Las suspensiones de suelo de los microcosmos se prepararon en agua destilada estéril (relación suelo:agua 1:2,5 y 1:7,5 para BUR y ZAV, respectivamente) utilizando tubos de centrífuga de polipropileno estériles (50 ml) con un volumen de 5 ml de esferas de vidrio también estériles (Ø 2 mm). Los tubos fueron agitados con vortex durante 2 min e inmediatamente se cargaron 200 µl de la suspensión en cada pocillo de la microplaca BDOBS, previamente cargada con el sustrato (volumen final= 300 µl). Las microplacas fueron incubadas a una temperatura constante de 30°C y las medidas cinéticas de fluorescencia se registraron desde el fondo de la placa (*bottom-reading*) cada 15 min durante 24 hs en un lector de fluorescencia para microplacas FLUOstar Optima (BMG Labtech, Offenburgo, Alemania), usando un filtro de excitación de 470 nm y uno de emisión de 610 nm. Las medidas de fluorescencia a cada tiempo (RFU) fueron divididas por el valor correspondiente a una hora de manera tal de expresar los datos como unidades relativas de fluorescencia normalizadas (NRFU). Los valores de NRFU fueron graficados en función del tiempo (horas) para obtener las curvas de respiración. Posteriormente, se calculó el área integrada bajo dichas curvas (AUC), entre 1 y 8 horas, con el software SigmaPlot 10.0 (Systat Software, Inc., San José, CA, USA). El cociente respiratorio (RQ) fue calculado como se indicó anteriormente en la Sección 4.5.1 del Capítulo 1.

4.4 *Análisis molecular de comunidades microbianas*

Para los análisis moleculares se consideraron únicamente los microcosmos control y con el máximo número de aplicaciones (tres aplicaciones). Las fracciones de suelo a analizar se

CAPÍTULO 2

extrajeron de los microcosmos al mismo tiempo en que se tomaron las muestras para el análisis de respiración (descrito anteriormente), y luego fueron preservadas a -20°C hasta el momento de la extracción y purificación del ADN de la comunidad. Para este fin se utilizó el kit comercial PowerSoil DNA Isolation kit (MoBio Inc., Carlsbad, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido en cada caso fue cuantificado en un fluorómetro Quantus (Promega) usando el kit QuantiFluor dsDNA (Promega). La abundancia de bacterias totales y de bacterias oxidantes del amoníaco (BOA) en la comunidad se estudió mediante PCR cuantitativa (qPCR) y la estructura de la comunidad de BOA mediante electroforesis en gel con gradiente de desnaturalizante (DGGE).

4.4.1 PCR cuantitativa (qPCR) de bacterias totales y de BOA

Mediante qPCR se determinó el número de copias del gen que codifica para el ARNr 16S (*Eubacteria*) y del gen *amoA* de BOA (*amoA*_{BOA}), que codifica para la subunidad α de la enzima amonio monooxigenasa bacteriana (BOA). En el primer caso se utilizó el par de cebadores Eub338F/Eub518R para *Eubacteria* descritos en la Tabla 4 del Capítulo 1 (Fierer *et al.*, 2005). El número de copias fue calculado a partir de una curva de calibración preparada con diluciones decimales del ADN genómico de *Escherichia coli* DH5 α , tal como se indicó en la Sección 4.4.2 del Capítulo 1. En el segundo caso se utilizó el par de cebadores *amoA*-1F/*amoA*-2R (Rotthauwe *et al.*, 1997) descritos en la Tabla 10.

Tabla 10. Cebadores utilizados para PCR seguido de electroforesis en gradiente de desnaturalizante (PCR-DGGE) y para PCR cuantitativa (qPCR) de bacterias oxidantes del amoníaco (BOA). Las letras en negrita indican cebadores directos (F) o reversos (R).

Cebador	Secuencia (5'→3')	Tamaño del producto (pb)	Gen	Referencia
<i>amoA</i> -1 F -clamp ^a <i>amoA</i> -2 R -TC (PCR-DGGE)	GGGGTTTCTACTGGTGGT CCCCTCTGCAAAGCCTTCTTC	531	<i>amoA</i>	Nicolaisen y Ramsing (2002)
<i>amoA</i> -1 F <i>amoA</i> -2 R (qPCR)	GGGGTTTCTACTGGTGGT CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	491	<i>amoA</i>	Rotthauwe <i>et al.</i> (1997)

^a clamp: Extensión rica en GC ligada al cebador directo (F) para PCR-DGGE: 5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG-3' (Muyzer *et al.*, 1993).

La composición de la mezcla de reacción para la amplificación del gen *amoA*_{BOA} fue la siguiente: 7,5 μ l de PCR iTaq Universal SYBR Green Supermix (2x; Bio-Rad Laboratories), 0,45 μ l del cebador directo y 0,9 μ l del cebador reverso (soluciones madre 10 μ M); Invitrogen), 1,5 μ l de ADN molde (~1–10 ng μ l⁻¹) y agua bidestilada estéril en cantidad

suficiente para 15 µl. El número de copias fue calculado a partir de una curva estándar construida con diluciones decimales (por duplicado) de un plásmido con el producto de PCR del gen *amoA* como inserto, de manera tal de cubrir el rango de 10^5 a 10^1 copias. El plásmido fue construido de acuerdo al procedimiento descrito por Zabaloy *et al.* (2016a) mediante clonado de un producto de PCR obtenido con los cebadores *amoA*-1F/*amoA*-2R a partir del ADN extraído de un suelo fertilizado. Mediante la secuenciación se confirmó que el inserto corresponde a una secuencia de 489 pb con 100% de identidad con el gen *amoA* bacteriano. La secuencia del clon (5-A51) ha sido depositada en el GenBank bajo el número de acceso KJ643949 (Zabaloy *et al.*, 2016a).

4.4.2 PCR-DGGE de BOA

La reacción de PCR inicial para el análisis por DGGE del gen *amoA*_{BOA} se llevó a cabo mediante una técnica semi-anidada descrita por Nicolaisen y Ramsing (2002). En esta primera PCR se utilizó el par de cebadores *amoA*-1F / *amoA*-2R (Rotthauwe *et al.*, 1997) sin la extensión GC (Tabla 10) y los siguientes reactivos: 1,2 µl de cloruro de magnesio (madre 25 mM); 2 µl de dNTP (madre 2 mM); 2 µl de buffer T-free (10×, Inbio Highway, Argentina); 0,6 µl de cada cebador (soluciones madre 10 µM); 0,1 µl de Taq polimerasa T-Free (5 U/ µl; Inbio Highway, Argentina); 1 µl de ADN molde y agua bidestilada estéril en cantidad suficiente para 20 µl. El programa de PCR utilizado fue el siguiente: 94°C 5 min, 40 ciclos de: 94 °C 1 min, 55 °C 1 min y 72 °C 1 min, y una etapa final de extensión de 10 min a 72°C. Los productos amplificados fueron verificados en un gel de agarosa 2% y las bandas del tamaño esperado (491 pb) fueron cortadas del gel y purificadas con un kit comercial (Axygen). El ADN extraído fue utilizado como molde para una segunda PCR utilizando el par de cebadores *AmoA*-1F-clamp y *AmoA*-2RTC (Tabla 10). La composición de la mezcla de reacción en este caso fue la siguiente: 1,25 µl de DMSO, 1,5 µl de cloruro de magnesio (madre 25 mM), 2,5 µl de dNTP (madre 2 mM), 5 µl de buffer Green GoTaq Flexi (5×), 0,75 µl de cada cebador (soluciones madre 10 µM), 0,125 µl de polimerasa GoTaqMDx Hot Start (5 U/µl) (Promega Corp., Madison, WI, USA), 1 µl de ADN molde y agua ultrapura estéril en cantidad suficiente para 25 µl. El programa de amplificación en esta segunda PCR consistió en una etapa inicial de 3 min a 94°C seguida de 18 ciclos compuestos por: una etapa de desnaturalización a 94 °C 45 s, una etapa de anillado a 55°C 45 s y una de extensión a 72 °C por 45 s + 1 s/ciclo. La extensión final fue de 72°C durante 5 min. Una vez verificados en gel de agarosa 2%, los productos de PCR fueron cargados en geles de poliacrilamida (8% de una mezcla 37:1 acrilamida-bisacrilamida en buffer TAE 1×), con un gradiente de desnaturalizante 50-70%. El 100% corresponde a una concentración de urea 7 M y 40% de

formamida deionizada (Green *et al.*, 2009). Por encima del gel con gradiente de desnaturalizante se colocó el gel de stacking (0% de desnaturalizante) sobre el cual se sembraron las muestras (20 μ l/calle). La electroforesis se llevó a cabo durante 6 hs a 200 V en buffer TAE 1x (pH 7,4) a una temperatura constante de 60°C usando el sistema SciePlas TV400-DGGE (SciePlas, Cambridge, UK). Los geles fueron teñidos en Gel Red 3x (Biotium, Hayward, CA) y luego visualizados bajo luz UV, fotografiados y digitalizados usando el software Kodak Digital Science Image Analysis v.3.0 (Eastman Kodak Company, New York, NY). El análisis de las imágenes de los geles se llevó a cabo con el software GelComparTM II v. 4.6 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). Los valores óptimos ingresados para la sustracción del background ("*background scale*") y el filtrado ("*Wiener cut-off*") fueron los calculados por el software (GelCompar IITM v. 4.6, Software Manual). Los amplicones del gen *amoA* de *Nitrosomonas europaea* y de una bacteria oxidante del amoníaco no cultivada designada como clon 5-A51 (número de acceso KJ643949 en GenBank, Zabaloy *et al.*, 2016a) fueron utilizados como marcadores y designados como posiciones internas de referencia para la normalización del gel (GelCompar IITM v. 4.6, Software Manual).

Tanto en ZAV como en BUR se sembraron dos de las tres réplicas de cada tratamiento (control y tres aplicaciones) de acuerdo a la capacidad del equipo disponible, de modo de poder incluir los dos sitios (H y NH) y los dos productos (IA y FC) en el mismo gel, evitando la separación en geles diferentes y, por lo tanto, la variabilidad asociada a corridas separadas.

4.5 Análisis estadístico

En el caso de los datos de respiración, el análisis estadístico se llevó a cabo mediante un ANOVA de un factor junto al test de Tukey de comparaciones múltiples ($\alpha=0,05$). Los supuestos de homocedasticidad y normalidad fueron evaluados mediante los test de Levene y de Shapiro-Wilks modificado, respectivamente ($\alpha=0,05$). Se utilizó una transformación logarítmica en aquellos casos puntuales en los que no se verificó uno o ambos supuestos. Los análisis mencionados se llevaron a cabo utilizando el software estadístico R v.3.2.3 (R Development Core Team, 2015).

Para detectar diferencias significativas en el número de copias de los genes estudiados entre microcosmos control y con tres aplicaciones se utilizó el test-t para muestras independientes ($\alpha=0,05$), con la corrección para variancias desiguales en aquellos casos donde se observó esta desigualdad. La normalidad de los datos fue evaluada mediante el test de Shapiro-Wilks modificado ($\alpha=0,05$).

El análisis estadístico de los perfiles normalizados con se llevó a cabo mediante un análisis de agrupamientos utilizando el software GelComparTM II v. 4.6. Las matrices de

CAPÍTULO 2

similitud fueron obtenidas utilizando el coeficiente de correlación de Pearson (r), uno de los coeficientes de similitud recomendados para el análisis de perfiles de DGGE (Schaffer y Muyzer, 2001). Se utilizó el algoritmo de agrupamiento jerárquico UPGMA una vez obtenidas las matrices de similitud y se calcularon los coeficientes de correlación cofenética global y de cada rama para evaluar la consistencia de los grupos (GelCompar II™ v. 4.6, Software Manual). Los agrupamientos fueron definidos a un nivel de similitud del 70% (valor de corte, Montecchia *et al.*, 2011) mediante la herramienta “*auto cut-off*” y la estabilidad interna de los mismos se evaluó mediante el método Jackknife de acuerdo con las herramientas y especificaciones del software (GelCompar II™ v. 4.6 Software Manual).

5. Resultados

5.1 Respiración de la comunidad microbiana

El análisis de respiración indicó un incremento significativo en el RQ con ácido *p*-cumárico en BUR_{NH} luego de dos ($P=0,031$; 1,7 veces) y tres ($P=0,023$; 1,74 veces) aplicaciones del IA en relación al control (Figura 13A) y luego de tres aplicaciones en BUR_H ($P=0,024$; 1,29 veces) (Figura 13B). En este último caso, también se detectó una diferencia estadísticamente significativa entre una y dos aplicaciones ($P=0,025$; 1,33 veces) como así también entre una y tres aplicaciones ($P=0,004$; 1,45 veces) (Figura 13B).

Para L-fenilalanina, se observó un incremento significativo ($P=0,027$; 1,85 veces) sólo en BUR_{NH} luego de tres aplicaciones (Figura 13A).

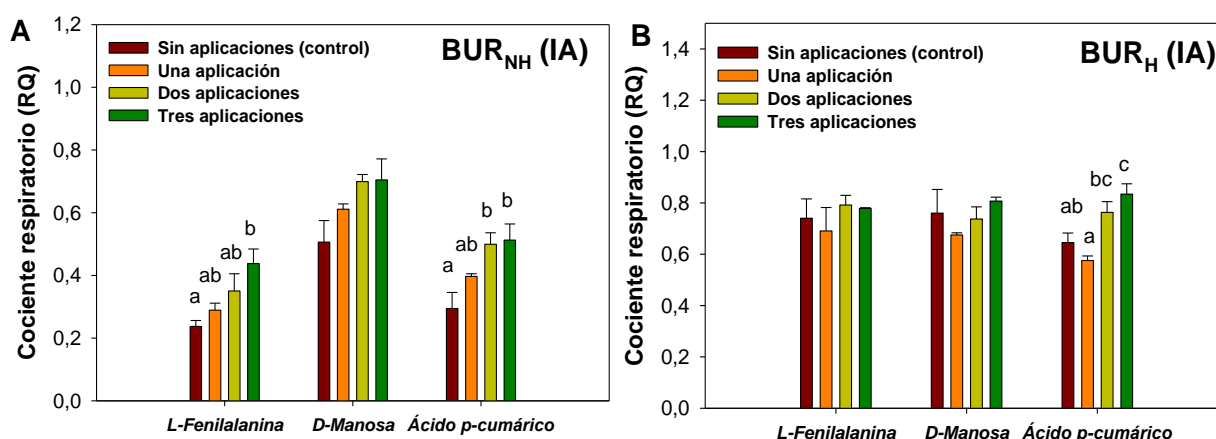


Figura 13. Análisis de respiración de la comunidad microbiana en microcosmos correspondientes a Mayor Buratovich (BUR). Se indica el cociente respiratorio para cada sustrato en el suelo sin historia (BUR_{NH}, **A**) y con historia (BUR_H, **B**) de exposición a glifosato bajo los diferentes tratamientos: cero (control), una, dos y tres aplicaciones del ingrediente activo (IA). El cociente corresponde a la relación entre la respiración basal (RB) y la respiración inducida por el sustrato (SIR). Las barras de error corresponden al error estándar de la media ($n=3$). Letras distintas indican diferencias significativas (Test de Tukey HSD, $P < 0,05$). La ausencia de letras indica diferencias no significativas.

Los resultados obtenidos con el FC fueron similares a los del IA en BUR_{NH}. Se detectó un incremento significativo para el ácido *p*-cumárico ($P=0,029$; 1,49 veces) luego de tres aplicaciones (Figura 14A). Sin embargo, en BUR_H, los resultados indicaron que no existen diferencias para ninguno de los sustratos analizados (Figura 14B), en contraste con lo observado para el IA (Figura 13B).

Al igual que en BUR, en ZAV (Figura 15) se observó un incremento significativo en el RQ con ácido *p*-cumárico luego de tres aplicaciones del IA ($P=0,027$; 1,58 veces), como así también entre una y tres aplicaciones ($P=0,017$; 1,78 veces). No obstante, en este caso los incrementos fueron detectados solamente en ZAV_H (Figura 15B). Las diferencias

observadas entre tratamientos para D-manosa y L-fenilalanina no fueron significativas. En el caso del FC, no se observaron diferencias en ninguno de los dos sitios (H y NH) y para ninguno de los tres sustratos (Figura 16).

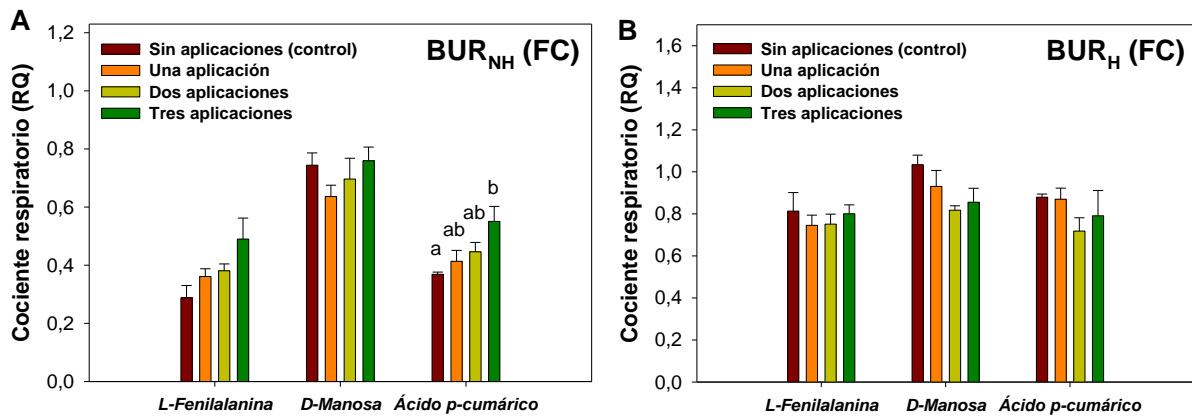


Figura 14. Análisis de respiración de la comunidad microbiana en microcosmos correspondientes a Mayor Buratovich (BUR). Se indica el cociente respiratorio para cada sustrato en el suelo sin historia (BUR_{NH}, **A**) y con historia (BUR_H, **B**) de exposición a glifosato bajo los diferentes tratamientos: cero (control), una, dos y tres aplicaciones del formulado comercial (FC). El cociente corresponde a la relación entre la respiración basal (RB) y la respiración inducida por el sustrato (SIR). Las barras de error corresponden al error estándar de la media ($n=3$). Letras distintas indican diferencias significativas (Test de Tukey HSD, $P<0,05$). La ausencia de letras indica diferencias no significativas.

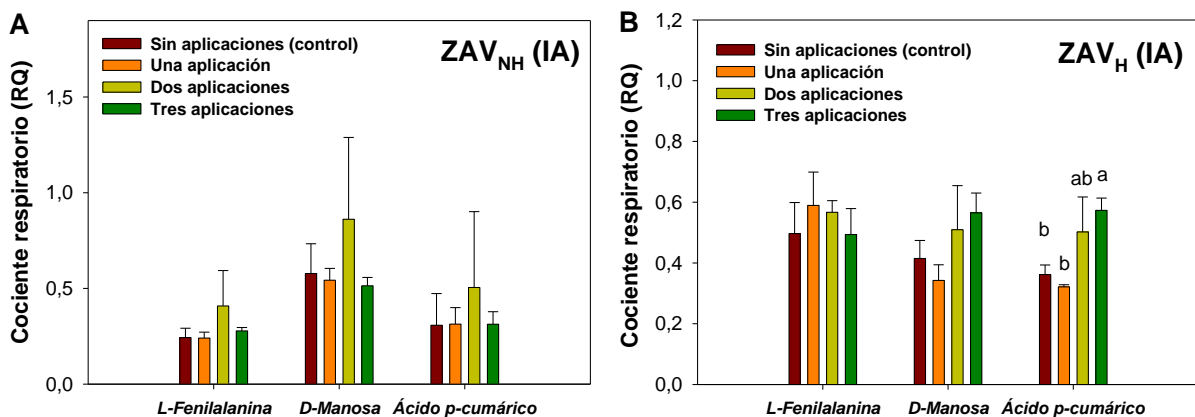


Figura 15. Análisis de respiración de la comunidad microbiana en microcosmos correspondientes a Zavalla. Se indica el cociente respiratorio para cada sustrato en el suelo sin historia (ZAV_{NH}, **A**) y con historia (ZAV_H, **B**) de exposición a glifosato bajo los diferentes tratamientos: cero (control), una, dos y tres aplicaciones del ingrediente activo (IA). El cociente corresponde a la relación entre la respiración basal (RB) y la respiración inducida por el sustrato (SIR). Las barras de error corresponden al error estándar de la media ($n=3$). Letras distintas indican diferencias significativas (Test de Tukey HSD, $P<0,05$). La ausencia de letras indica diferencias no significativas.

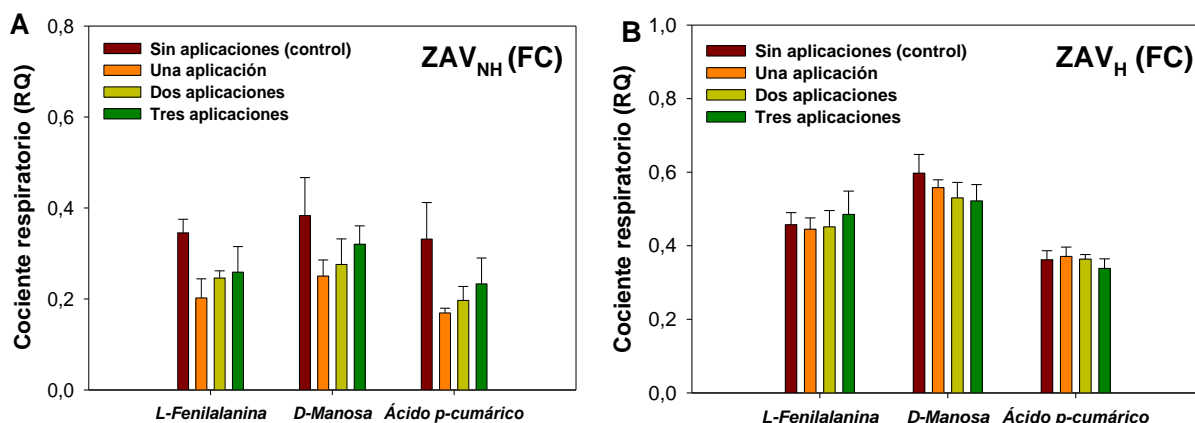


Figura 16. Análisis de respiración de la comunidad microbiana en microcosmos correspondientes a Zavalla. Se indica el cociente respiratorio para cada sustrato en el suelo sin (BUR_{NH}, **A**) y con (BUR_H, **B**) historia de exposición a glifosato bajo los diferentes tratamientos: cero (control), una, dos y tres aplicaciones del formulado comercial (FC). El cociente corresponde a la relación entre la respiración basal (RB) y la respiración inducida por el sustrato (SIR). Las barras de error corresponden al error estándar de la media ($n=3$). Letras distintas indican diferencias significativas (Test de Tukey HSD, $P<0,05$). La ausencia de letras indica diferencias no significativas.

5.2 Análisis molecular de comunidades microbianas

5.2.1 Abundancia de bacterias totales y BOA

Los efectos de aplicaciones repetidas (tres aplicaciones vs control) en la abundancia de bacterias totales y BOA se evaluaron mediante qPCR del gen del ARNr 16S de *Eubacteria* y el gen *amoA*_{BOA}, respectivamente. Los valores correspondientes al número de copias de estos dos genes obtenidos en la qPCR fueron utilizados sólo como estimaciones de abundancia, no se realizaron conversiones a número de células para evitar introducir errores (por ejemplo, número desconocido o variable de operones en las diferentes especies presentes en comunidades bacterianas).

Las ecuaciones obtenidas del ajuste lineal de las curvas estándar, que describen la relación entre los valores de *Ct* y el número de copias de cada gen, fueron las siguientes:

$$Ct = 37,45 - 3,58 \log_{10} (n^{\circ} \text{ copias}) \text{ para el gen del ARNr 16S } (R^2 = 0,99);$$

$$Ct = 37,54 - 3,91 \log_{10} (n^{\circ} \text{ copias}) \text{ para el gen } amoA_{BOA} (R^2=0,99).$$

Las eficiencias de amplificación de la PCR fueron 90% para el gen del ARNr 16S y 80% para el gen *amoA*_{BOA}.

No se observaron incrementos o disminuciones estadísticamente significativas en la abundancia de bacterias totales (copias del gen del ARNr 16S μg^{-1} ADN) tanto en BUR como en ZAV luego de tres aplicaciones del IA o del FC (Anexo II, Figura 50). De manera

similar, las diferencias en el número de copias de *amoA*_{BOA} entre microcosmos control y tratados no fueron significativas en ningún caso ($P > 0,05$; Figura 17).

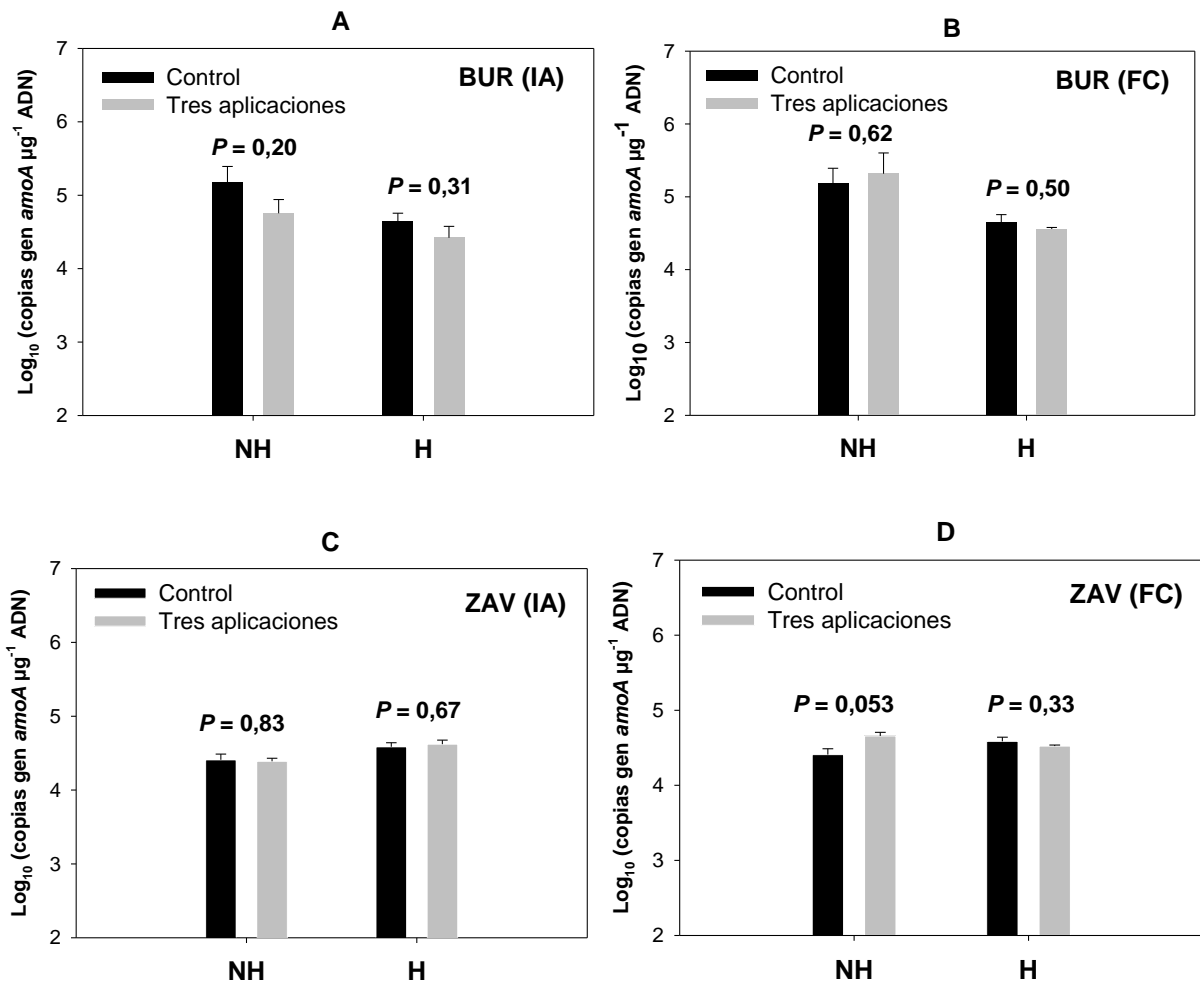


Figura 17. Cuantificación de bacterias oxidantes del amoníaco (BOA) mediante PCR cuantitativa (qPCR). Se indica el número de copias (copias μg^{-1} de ADN) del gen *amoA* de BOA, en microcosmos control y con tres aplicaciones acumuladas de glifosato, para sitios con (H) y sin (NH) historia del herbicida en Mayor Buratovich (A-B) y Zavalla (C-D). Las figuras A-D corresponden al ingrediente activo (IA) y B-D al formulado comercial (FC). Las barras de error corresponden al error estándar de la media ($n=3$). Los asteriscos indican diferencias significativas (Test-t para muestras independientes, $P < 0,05$). La ausencia de asteriscos indica que no se detectaron diferencias significativas. Los valores de P se encuentran indicados para cada comparación de medias.

Cuando se calculó la relación entre el número de copias del gen *amoA*_{BOA} en relación al gen del *ARNr 16S*, es decir, la abundancia relativa (AR), se detectaron diferencias estadísticamente significativas tanto en BUR_H ($P=0,024$) como en BUR_{NH} ($P=0,0049$) entre microcosmos control y con tres aplicaciones del FC pero no del IA (Tabla 11). El comportamiento fue opuesto entre ambos sitios: la abundancia relativa se incrementó 2,57 veces en BUR_{NH} mientras que disminuyó en una relación similar (2,14 veces) en BUR_H. A

CAPÍTULO 2

pesar de que la tendencia fue muy similar en ZAV (incremento en el sitio NH y disminución en el sitio H), en este caso las diferencias no resultaron significativas ni con el IA ni con el FC (Tabla 11).

Tabla 11. Abundancia relativa de bacterias oxidantes del amoníaco (BOA). Se indica la relación entre el número de copias del gen *amoA* de BOA (*amoA*_{BOA}) y el gen que codifica para el ARNr 16S de *Eubacteria*, en microcosmos control y con tres aplicaciones acumuladas del ingrediente activo (IA) y del formulado comercial (FC), para sitios con (H) y sin (NH) historia del herbicida, en Mayor Buratovich (BUR) y Zavalla (ZAV). El error estándar de la media ($n=3$) se indica entre paréntesis. Los valores en negrita indican diferencias significativas respecto del control (Test-t para muestras independientes, $P<0,05$).

Abundancia relativa (BOA:bacterias totales) (N° copias gen <i>amoA</i> _{BOA} : N° copias gen ARNr 16S)				
Tratamiento	BUR		ZAV	
	NH	H	NH	H
Control	5,62.10 ⁻⁵ (8,65.10 ⁻⁶)	3,71.10 ⁻⁵ (4,75.10 ⁻⁶)	1,24.10 ⁻⁴ (2,46.10 ⁻⁵)	2,15.10 ⁻⁴ (1,19.10 ⁻⁵)
Tres aplicaciones IA	8,90.10 ⁻⁵ (1,82.10 ⁻⁵)	1,36.10 ⁻⁵ (9,29.10 ⁻⁶)	1,18.10 ⁻⁴ (8,40.10 ⁻⁶)	2,39.10 ⁻⁴ (2,57.10 ⁻⁵)
Tres aplicaciones FC	1,45.10⁻⁴ (4,94.10⁻⁶)	1,72.10⁻⁵ (3,45.10⁻⁶)	2,56.10 ⁻⁴ (6,25.10 ⁻⁵)	1,75.10 ⁻⁴ (1,171.10 ⁻⁵)

5.2.2 Estructura de la comunidad de BOA

En las Figuras 18 y 19 se muestran los perfiles de DGGE correspondientes a BUR y ZAV, respectivamente, junto con los dendrogramas del análisis de agrupamientos Pearson-UPGMA. La diferencia más clara y apreciable al comparar visualmente los perfiles se presentó en Mayor Buratovich (Figura 18) donde aquellos perfiles correspondientes al sitio NH, independientemente del tratamiento, presentaron menor complejidad (menor número de bandas) que los del sitio H. No obstante esta consideración, se realizó un análisis basado en perfiles densitométricos para estudiar adecuadamente las similitudes entre perfiles control y con tres aplicaciones, como se mencionó en la Sección 4.4.3.

Un aspecto destacable que se observó en BUR fue que los perfiles de microcosmos tratados con el IA resultaron más similares en relación al control que los perfiles de microcosmos tratados con el FC, tal como lo indican cuantitativamente los coeficientes de correlación de Pearson (matriz de similitud, Anexo II, Figura 51). Esta tendencia se observa claramente en los agrupamientos indicados en el dendrograma de la Figura 18, tanto para el

sitio H como para el NH. A un nivel de similitud del 70% (*cut-off*), se observó un *cluster* que contiene a los perfiles correspondientes a tres aplicaciones de IA y al control (*cluster* II en el caso del sitio H; *cluster* III en el caso del sitio NH). En cambio, los perfiles correspondientes a microcosmos tratados con el FC no forman parte de estos *clusters*.

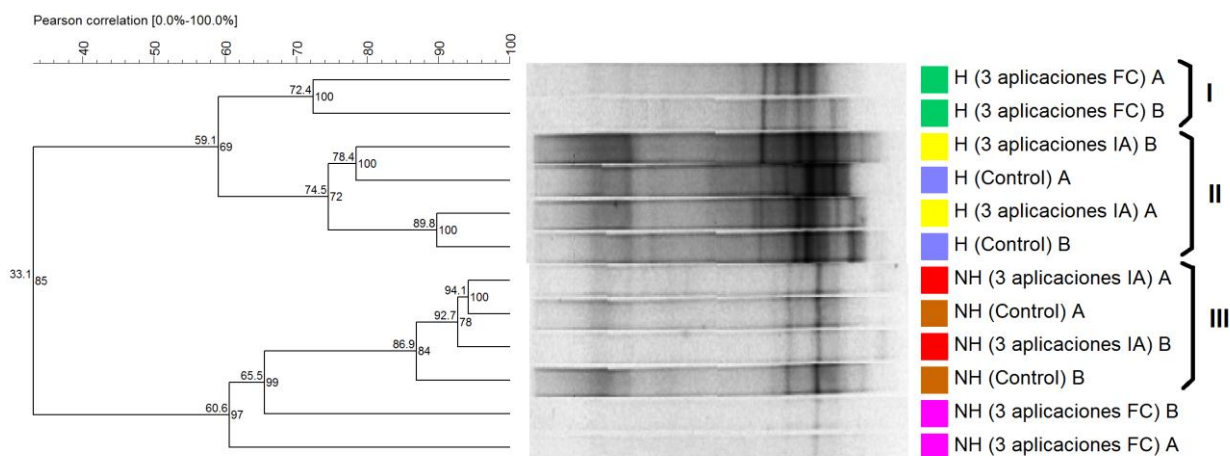


Figura 18. Análisis de agrupamiento de perfiles electroforéticos de bacterias oxidantes del amoníaco (BOA) para Mayor Buratovich (BUR). Los perfiles se obtuvieron mediante PCR del gen *amoA* y posterior electroforesis en gradiente de desnaturante (PCR-DGGE). El dendrograma corresponde al análisis de agrupamientos de los perfiles densitométricos utilizando el coeficiente de correlación de Pearson (r) y el algoritmo UPGMA. Las muestras control y con tres aplicaciones acumuladas del IA o del FC se encuentran indicadas en diferentes colores, tanto para el sitio con historia (H) como el sin historia (NH). Se indican también los *clusters* (I, II y III) definidos a un nivel de similitud del 70% con un 100% de estabilidad interna, según el método Jackknife. Las primeras letras de los rótulos indican el sitio (H y NH) y la última letra indica la réplica (A o B). El número a la derecha de cada nodo indica el coeficiente de correlación cofenética y el número de la izquierda el porcentaje de similitud ($r \times 100$).

El patrón mencionado para BUR no se detectó en las muestras de ZAV, donde se observó una mayor variabilidad de los perfiles con el mismo tratamiento y una menor coherencia en los agrupamientos, particularmente para los perfiles control (Figura 19). En este caso, a un nivel de similitud del 70%, se observó un *cluster* que reúne a los perfiles de microcosmos tratados con el FC y una réplica del control, tanto para el sitio H (*cluster* III) como para el sitio NH (*cluster* II). Como se muestra en la Figura 20, la segunda réplica del control de cada sitio (indicada como réplica A) muestra una baja similitud respecto de la réplica B, presente en los agrupamientos mencionados anteriormente. Asimismo, se observó una baja similitud entre los perfiles de microcosmos tratados con el FC y con el IA (en ambos sitios) (Anexo II, Figura 52). Para el sitio H, en particular, los perfiles correspondientes a tres aplicaciones del IA forman un *cluster* separado (*cluster* I) respecto del FC y de los perfiles control.

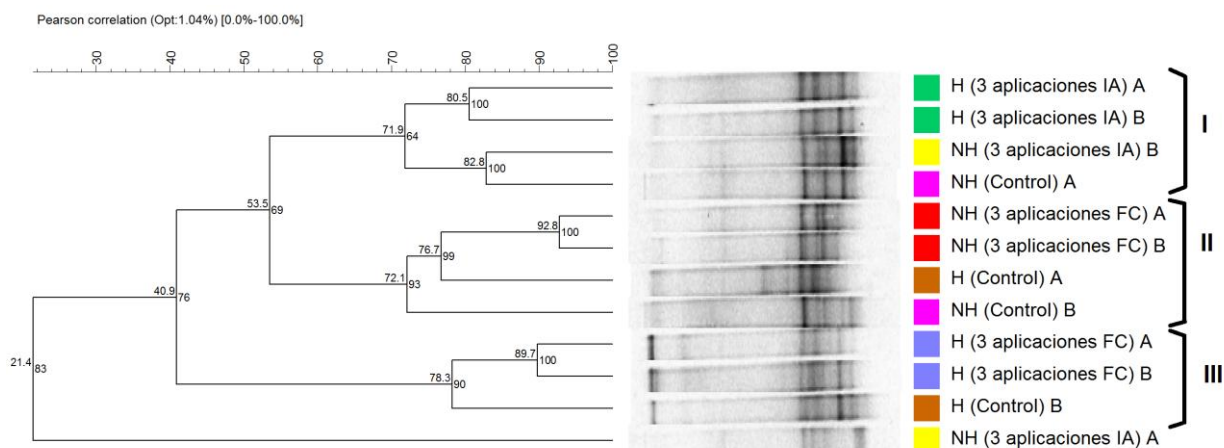


Figura 19. Análisis de agrupamiento de perfiles electroforéticos de bacterias oxidantes del amoníaco (BOA) para Zavalla (ZAV). Los perfiles se obtuvieron mediante PCR del gen *amoA* y posterior electroforesis en gradiente de desnaturizante (PCR-DGGE). El dendrograma corresponde al análisis de agrupamientos de los perfiles densitométricos utilizando el coeficiente de correlación de Pearson (r) y el algoritmo UPGMA. Las muestras control y con tres aplicaciones acumuladas del IA o del FC se encuentran indicadas en diferentes colores, tanto para el sitio con historia (H) como el sin historia (NH). Se indican también los *clusters* (I, II y III) definidos a un nivel de similitud del 70% con un 100% de estabilidad interna, según el método Jackknife. Las primeras letras de los rótulos indican el sitio (H y NH) y la última letra indica la réplica (A o B). El número a la derecha de cada nodo indica el coeficiente de correlación cofenética y el número de la izquierda el porcentaje de similitud ($r \times 100$).

6. Discusión

En este estudio se evaluaron los efectos de aplicaciones repetidas de glifosato en parámetros microbiológicos de suelos con y sin historia de glifosato. Se realizó un análisis fisiológico para estudiar la respuesta respiratoria con tres sustratos carbonados de diferente estructura química: L-fenilalanina (aminoácido) y D-manosa (glúcido) ampliamente utilizados por la microbiota del suelo, y también ácido *p*-cumárico (fenilpropanoide) que constituye uno de los productos de la degradación de la lignina en el suelo por parte de subpoblaciones especializadas de bacterias y hongos (Bugg *et al.*, 2011). De manera similar, se recurrió a métodos moleculares independientes de cultivo para estudiar no sólo la abundancia de bacterias totales en las comunidades sino también la estructura y la abundancia de un grupo fisiológico especializado: las BOA. De acuerdo con la revisión de la literatura, este estudio constituye el primero en abordar los efectos de aplicaciones repetidas de glifosato sobre BOA, un grupo clave en el ciclo del nitrógeno y ecológicamente relevante para la productividad de los suelos agrícolas.

6.1 Efecto de aplicaciones repetidas en la fisiología de las comunidades

Como se mencionó en secciones anteriores, se calculó un cociente respiratorio ($RQ=RB/SIR$) a partir de los datos obtenidos en las mediciones de respiración microbiana.

CAPÍTULO 2

Este índice está directamente relacionado con el concepto de cociente metabólico ($qCO_2=RB/BM$) (Anderson y Domsch, 1993), según Cheng *et al.* (1996), tal como se indica en la Sección 4.2 de la Introducción General. Los incrementos en el índice qCO_2 , análogo al RQ calculado, se encuentran frecuentemente asociados a la exposición a agentes de perturbación en el suelo como contaminación con metales pesados y otros contaminantes debido al requerimiento de más energía para sostener la biomasa bajo condiciones desfavorables (Dilly, 2005). En consecuencia, los incrementos en el RQ observados para el ácido *p*-cumárico podrían estar indicando un estrés metabólico de la comunidad microbiana que ha sido expuesta repetidamente a glifosato, probablemente relacionada con el requerimiento de una mayor energía de mantenimiento. En relación a ello, es importante remarcar que el glifosato inhibe la vía del shikimato y como consecuencia de esta inhibición existe un “drenaje energético” resultante del ATP utilizado en la acumulación de shikimato y otros ácidos hidroxibenzoicos (Zablotowicz y Reddy, 2004; Zabaloy *et al.*, 2012). Al mismo tiempo, el incremento detectado en los valores de RQ al incrementarse el número de aplicaciones acumuladas, es consistente con estudios que reportan una mayor dificultad de la comunidad para enfrentarse a disturbios adicionales luego de un disturbio inicial, debido al consumo energético que se destina a detoxificación y reparación del daño tras la primera exposición (Griffiths y Philippot, 2013). Los incrementos observados en el RQ (RB/SIR) podrían explicarse por una disminución en la biomasa microbiana (SIR), por un incremento en la respiración basal (RB) o por ambos cambios simultáneamente. Debe tenerse en cuenta, además, que este índice tiene las mismas debilidades que el qCO_2 : no debe ser considerado como un bioindicador consistente y sensible de disturbio en la estructura de las comunidades microbianas (Wardle y Ghani, 1995) dado que no responde predeciblemente a los cambios en la estructura de las mismas. Esto se debe a que estos índices ecofisiológicos son capaces de confundir los efectos de las perturbaciones introducidas (en este caso frente a aplicaciones de glifosato) con estreses que se encuentren afectando naturalmente a las comunidades microbianas en los sitios H y NH (Wardle y Ghani, 1995). En cambio, se consideran indicadores apropiados en la determinación de cuán eficientemente son utilizados los recursos de C por la biomasa microbiana del suelo, reflejando el requerimiento de energía de mantenimiento y del metabolismo catabólico (Anderson, 1994; Wardle y Ghani, 1995), como así también el grado de limitación nutricional o disponibilidad de carbono de las comunidades microbianas (Cheng *et al.*, 1996).

El análisis de la respuesta respiratoria para el ácido *p*-cumárico en BUR (Figura 13A), indica que, en el sitio NH, el incremento significativo en el RQ respecto del control ocurre luego de dos aplicaciones, mientras que en el sitio H ocurre luego de la tercer aplicación.

CAPÍTULO 2

Asimismo, el incremento luego de tres aplicaciones respecto del control es de mayor magnitud en el suelo NH (1,74 veces) que en el H (1,29 veces). Estas diferencias en las respuestas sugieren una menor estabilidad de la comunidad microbiana a la exposición repetida a glifosato (IA) en el suelo sin historia de exposición (NH). Dado que en los ambientes perturbados (en este caso el sitio H) predominan microorganismos del tipo *estrategas-r*, caracterizados por una mayor resistencia a disturbios o condiciones ambientales que cambian rápidamente (Dilly *et al.*, 2005), esta característica podría explicar en parte el comportamiento mencionado anteriormente al comparar los suelos H y NH de BUR. La diferencia observada entre suelos H y NH es todavía más clara en el caso del FC, donde se observa que el incremento del RQ se produce sólo en el suelo NH. Debe destacarse que estas suposiciones se basan específicamente en comparar el número de aplicaciones acumuladas que se requieren para observar un incremento significativo del RQ respecto del control. Sin embargo, como se mencionó en el párrafo anterior, los incrementos en el RQ por sí mismos no deben ser considerados como indicadores de disturbio ecológico resultantes de cambios direccionados en la estructura de la comunidad (*ecosystem development*) (Wardle y Ghani, 1995). Sólo indican que existe una situación adversa a nivel fisiológico (estrés metabólico) debido a un mayor gasto de energía de mantenimiento que hace menos eficiente el uso del sustrato carbonado (ácido *p*-cumárico en este caso) (Wardle y Ghani, 1995; Dilly, 2005).

Un aspecto interesante de remarcar es la observación de diferencias significativas en el RQ únicamente con L-fenilalanina y con ácido *p*-cumárico, principalmente con este último sustrato. Estos resultados son particularmente importantes por dos razones. En primer lugar, señalan que la respuesta respiratoria con ácido *p*-cumárico sería más sensible como indicador que la respuesta con D-manosa. Por ende, debe ser tomada en cuenta para nuevas evaluaciones que requieran de indicadores fisiológicos adecuados. En segundo lugar, guardan una relación intrínseca con el modo de acción del glifosato, el cual es un inhibidor de la vía del shikimato, la principal ruta biosintética de compuestos fenólicos y de aminoácidos aromáticos. La inhibición conduce a la acumulación y excreción de ácidos fenólicos en especies sensibles (Moorman *et al.*, 1992), impacto metabólico que podría explicar las diferencias detectadas en el RQ del ácido *p*-cumárico entre muestras control y las que recibieron hasta tres aplicaciones de glifosato. Asimismo, es importante resaltar que el ácido *p*-cumárico es un fenilpropanoide ecológicamente relevante relacionado con la degradación de la lignina, un proceso clave en el ciclado del C en el suelo (Peng *et al.*, 2003). La capacidad de degradar este compuesto y otros *p*-hidroxicinamatos ha sido descrita tanto en subpoblaciones bacterianas del suelo bajo condiciones aeróbicas (Baude

et al., 2016) y anaeróbicas (Hirakawa *et al.*, 2012) como así también en hongos (Blum y Schafer, 1988). Todas estas consideraciones podrían estar indicando que un grupo específico de microorganismos, capaces de degradar el ácido *p*-cumárico y otros ácidos fenólicos derivados de la degradación de la lignina, son afectados por aplicaciones repetidas de N-(fosfonometil)glicina presente en el IA y en el FC. Al mismo tiempo, ciertos fenilpropanoides como el metil-*p*-cumarato han sido reconocidos como inhibidores biológicos de la nitrificación (IBNs) (Subbarao *et al.*, 2015). Teniendo en cuenta esto y que se observó un impacto de aplicaciones repetidas en el catabolismo del ácido *p*-cumárico, puede suponerse entonces que aquellos cambios importantes producidos en los niveles de este fenilpropanoide (o derivados de él) durante la degradación de la lignina bajo influencia de glifosato, podrían tener un efecto indirecto en BOA y en la nitrificación. Futuros estudios deberán abordar esta hipótesis.

Finalmente, es importante resaltar que uno de los mecanismos de acción del glifosato en plantas consiste en la estimulación de la actividad fenilalanina amonio liasa (PAL) con la consecuente acumulación de compuestos fenólicos derivados de la enzima PAL (Duke y Hoagland, 1978; Duke *et al.*, 1980). La actividad PAL, a su vez, conduce a la formación de ácido trans-cinámico, el compuesto del cual deriva el ácido *p*-cumárico a través de la enzima ácido cinámico 4-hidroxilasa. Si bien ha sido mucho menos estudiada a nivel microbiano, la enzima PAL también se encuentra presente en bacterias y hongos. De hecho, se ha propuesto que las plantas han adquirido el gen codificante para esta enzima de origen bacteriano por medio de eventos de transferencia horizontal de genes (THG) (Emiliani *et al.*, 2009). De esta manera, si el mismo mecanismo de acción del glifosato sobre la enzima PAL se presentara en bacterias, entonces cabría esperar un impacto metabólico a nivel del ácido *p*-cumárico que podría explicar, en parte, el impacto observado en el RQ para este sustrato.

6.2 Efecto de aplicaciones repetidas en la abundancia de bacterias totales y BOA

Tal como lo indicaron los resultados de la qPCR, la abundancia de bacterias totales no es afectada luego de tres aplicaciones del IA o del FC, tanto en ZAV como en BUR (Anexo II, Figura 50). En un estudio previo, Zabaloy *et al.* (2012) tampoco reportaron diferencias significativas en la abundancia bacteriana de microcosmos expuestos a una dosis única baja ($15 \mu\text{g g}^{-1}$ de suelo) o alta ($150 \mu\text{g g}^{-1}$ de suelo) del IA. A su vez, un resultado similar se observó recientemente al comparar microcosmos que recibieron glifosato ($150 \mu\text{g IA g}^{-1}$ suelo) más fertilizante (G+F), fertilizante sólo (F) y control (CT): sólo resultó significativo el

CAPÍTULO 2

efecto principal del tiempo post-muestreo pero no el efecto vinculado al tratamiento (Zabaloy *et al.*, 2017).

La abundancia de *amoA*_{BOA} tampoco presentó diferencias significativas entre microcosmos con tres aplicaciones de glifosato (IA o FC) y microcosmos control (Figura 17). Este resultado es consistente con el reportado por Zabaloy *et al.* (2016a) para un experimento a campo, donde no se encontraron diferencias en la abundancia estimada de BOA al comparar parcelas tratadas con la dosis más alta de glifosato (2x) y aquellas utilizadas como control. Al mismo tiempo, estos resultados también concuerdan con los reportados por Zabaloy *et al.* (2017), los cuales indicaron diferencias no significativas a los 4 días post-tratamiento entre microcosmos que recibieron glifosato + fertilizante (G+F) respecto de microcosmos control (CT) y de aquellos que recibieron sólo fertilizante (F). Si bien en este último trabajo se observaron diferencias entre G+F y CT a los 32 días post-aplicación, no se observaron diferencias para la fecha inicial (4 días post-aplicación), en coincidencia con el momento de muestreo final de este trabajo (dos días post-aplicación).

Al analizar la abundancia de BOA relativa a bacterias totales, se detectaron diferencias significativas entre microcosmos control y con tres aplicaciones (Tabla 11). La observación de diferencias entre ambos tratamientos sólo para el FC es consistente con la observación de mayores efectos de los FC respecto del IA debido a la presencia de diversos aditivos (Cedergreen y Streibig, 2005; Qiu *et al.*, 2013). Al mismo tiempo es importante remarcar la tendencia contrastante de los suelos H y NH al comparar microcosmos control y con tres aplicaciones: se observó un incremento en la abundancia relativa para el sitio NH mientras que contrariamente en el suelo H se detectó una disminución. Este resultado podría explicarse en base a diferencias en la estructura de las comunidades de BOA, inherentes a la historia de cada uno de los sitios. Los mismos no difieren solamente en la historia de exposición a glifosato sino también en el nivel de exposición a otras perturbaciones.

En este trabajo se consideró únicamente la abundancia del gen *amoA*_{BOA}. No obstante, un estudio reciente reveló una disminución significativa en la abundancia de transcritos de este gen en microcosmos expuestos al herbicida diazomet con respecto a microcosmos control (Feld *et al.*, 2015). Este resultado sugiere que la cuantificación de transcritos es particularmente importante y deberá ser considerada en próximos estudios que aborden el impacto de aplicaciones repetidas de glifosato y de otros herbicidas. Feld *et al.* (2015) reportaron también una variación temporal de la respuesta: el número de copias del gen *amoA*_{BOA} disminuyó a los tres días de la aplicación pero a los 28 días se detectó un incremento significativo. Asimismo, para un ensayo en microcosmos en los que se comparó la aplicación de glifosato sólo (G), glifosato + fertilizante (G+F) y microcosmos control (CT)

Zabaloy *et al.* (2017) no observaron diferencias entre G+F y CT a los 4 días post-aplicación (sólo se detectó entre F y CT), pero sí se observó una abundancia significativamente mayor a los 32 días en G+F respecto del CT. De esta manera, si bien en este estudio de aplicaciones repetidas de glifosato no se evaluaron fluctuaciones temporales, las variaciones en la dinámica poblacional de BOA deberían evaluarse en futuros estudios considerando múltiples momentos de muestro post-tratamiento.

6.3 Efecto de aplicaciones repetidas en la estructura de la comunidad de BOA

Los resultados del análisis de estructura de la comunidad de BOA mediante PCR-DGGE indicaron diferencias en los perfiles al comparar microcosmos control y con tres aplicaciones, en ambas localidades (ZAV y BUR). Sin embargo, las evidencias más claras de ello (de mayor consistencia en el análisis de agrupamientos), se observan para el caso de BUR, donde en ambos sitios (H y NH) las similitudes más bajas respecto del control se observan para el tratamiento con el FC. De hecho, a un 70% de similitud pudieron definirse grupos que separan claramente a los microcosmos control y a los que recibieron tres aplicaciones del FC. Esta observación es consistente con los resultados discutidos previamente sobre abundancia relativa de BOA, donde las diferencias respecto del control se observaron sólo para el FC y fueron detectadas en ambos sitios (H y NH).

Como se mencionó anteriormente, los perfiles de microcosmos control de sitios H y NH en BUR mostraron una baja similitud, reflejando la diferente composición de la comunidad de BOA. En relación a ello, es importante destacar que recientemente se han reportado diferencias en las comunidades microbianas de microorganismos oxidantes del amoníaco luego de la conversión de suelos forestales a suelos agrícolas, desde una nitrificación heterotrófica dominada por hongos hacia una nitrificación autotrófica dominada principalmente por bacterias (Wang *et al.*, 2015). La detección de diferencias entre los perfiles de sitios H y NH podría reflejar las diferencias que naturalmente existen entre ecosistemas no disturbados y disturbados (no sólo por herbicidas sino también por otros factores).

En lo que respecta a las modificaciones observadas en los perfiles de BOA luego de aplicaciones repetidas, en principio las mismas podrían explicarse (al menos parcialmente) por la potencial utilización de glifosato como una fuente de P y N por parte de poblaciones de BOA capaces de utilizar los productos de degradación del glifosato (no así como fuente de C y energía ya que la vasta mayoría de las BOA son quimiolitautotróficas). Sin embargo, esto no parece ser la explicación a las diferencias observadas en la estructura ya que las BOA se caracterizan por un lento crecimiento, y en un periodo de incubación de hasta 4-6

CAPÍTULO 2

semanas los cambios en la estructura de la comunidad no serían detectables (Chu *et al.*, 2007). Las fertilizaciones fosforadas y nitrogenadas han demostrado tener una notable influencia en la composición de AOA y BOA, aunque sólo se ha observado esto en tratamientos de larga duración (Xue *et al.*, 2016). En experimentos de corta duración de hasta seis semanas, no se han observado cambios en las comunidades de BOA cuando se adiciona amonio al suelo (Avrahami *et al.*, 2002; Mendum *et al.*, 1999). Asimismo, cabe esperar que el aporte de N proveniente de la degradación del glifosato sea bajo como para inducir alguna modificación. Recientemente, el tratamiento de microcosmos con fertilizante en una dosis baja, ya sea sólo o combinado con glifosato, tampoco indujo cambios en la estructura de la comunidad de BOA, tal como se determinó por PCR-DGGE (Zabaloy *et al.*, 2017). De esta manera, teniendo en cuenta las observaciones mencionadas, es posible suponer que las diferencias en los perfiles de BOA responden a un efecto directo de toxicidad del herbicida más que a un efecto indirecto (aporte nutricional de N y P provenientes de la degradación cometabólica de glifosato), sobre todo considerando la reconocida sensibilidad de las BOA tanto a pesticidas (Hernández *et al.*, 2011; Feld *et al.*, 2015) como así también a sustancias que se encuentran naturalmente en el suelo (por ejemplo, metabolitos secundarios de plantas; Ward *et al.*, 2015). Si bien las comunidades microbianas del suelo se caracterizan por una gran adaptabilidad y versatilidad frente a condiciones cambiantes, lo cual relativiza el concepto del efecto “tóxico” de ciertos compuestos químicos, en este caso en particular la corta duración del ensayo restringe la posibilidad de atribuir las diferencias observadas a cambios en la estructura de la comunidad relacionados con el aporte nutricional del glifosato degradado. El efecto directo podría estar vinculado a los aditivos presentes en los formulados comerciales, dado que en BUR se observó claramente una menor similitud de los perfiles de microcosmos tratados con el FC (respecto del control) que aquellos que recibieron el IA. No obstante, el efecto mencionado no se atribuiría necesariamente sólo a los aditivos, podría responder también a una interacción entre ambos componentes (glifosato + aditivos) (Krogh *et al.*, 2003). Efectos directos de un FC de glifosato también han sido propuestos por sobre efectos indirectos en comunidades microbianas de ecosistemas acuáticos en un experimento de corta duración en mesocosmos (Pérez *et al.*, 2007).

Por último, es importante destacar que si bien se ha propuesto un efecto directo, las evidencias obtenidas no son suficientes para descartar posibles efectos indirectos. Estudios futuros deberán enfocarse en los mecanismos por los cuales se producen estas modificaciones en la estructura de la comunidad.

6.4 Consideraciones sobre la dosis de glifosato

Las diferencias observadas en el comportamiento de los suelos de ZAV y BUR frente a aplicaciones repetidas podrían estar relacionadas con diferencias inherentes a la composición de las comunidades microbianas y a las propiedades fisicoquímicas de los suelos de cada localidad. La clase textural de cada suelo podría ser determinante en las diferencias entre ZAV y BUR. Los suelos H y NH de Zavalla se caracterizan por un contenido de arcillas notablemente superior a los suelos de Mayor Buratovich (franco arenosos) (Tabla 9). Diferentes estudios indican que un mayor contenido de arcillas favorece la adsorción de glifosato en el suelo (Glass, 1987; Dion *et al.*, 2001; Hiera da Cruz *et al.*, 2007; Okada *et al.*, 2016), sugiriéndose que el glifosato podría formar complejos con los cationes liberados de las arcillas por reacciones de intercambio catiónico con protones en solución (Glass, 1987). Sprankle *et al.* (1975) reportaron una adsorción más fuerte de glifosato en un suelo franco arcilloso que en un suelo arenoso, atribuyendo a los minerales de la arcilla como los responsables de la adsorción. En base a estas consideraciones, la exposición real de las comunidades microbianas del suelo al herbicida en ambas localizaciones (ZAV y BUR) probablemente difiera para la misma dosis aplicada. La posible adsorción de glifosato en ZAV, favorecida por el alto contenido de arcillas de estos suelos, podría explicar por qué no se observan diferencias significativas en la abundancia de BOA luego de tres aplicaciones del IA o del FC. En el caso de BUR, a partir de una menor capacidad de adsorción de glifosato al suelo, cabría esperar diferencias significativas en la abundancia relativa de BOA tanto con el IA como con el FC. Sin embargo, la observación de diferencias sólo con el FC indica que las mismas estarían más relacionadas con los aditivos presentes en el formulado (o con su interacción con el IA) que con el IA mismo, tal como se mencionó previamente en la Sección 6.2.

6.5 Consideraciones finales

Los resultados obtenidos en el análisis molecular en BUR apoyan la hipótesis inicial: los perfiles de DGGE y la AR de BOA mostraron modificaciones respecto del control luego de tres aplicaciones del FC pero no del IA. En cambio, este último mostró un mayor impacto a nivel fisiológico considerando que se detectaron más diferencias significativas que con el FC. Por otra parte, a nivel de estructura de la comunidad de BOA, las diferencias observadas entre el IA y el FC en BUR son apoyadas por investigaciones previas que reportan un comportamiento diferente de estos productos (Qiu *et al.*, 2013; Sihtmäe *et al.*, 2013) debido a la presencia de diversos aditivos en los FC (Krogh *et al.*, 2003). Finalmente, los resultados de este estudio sugieren investigar en próximos estudios una potencial

relación entre el impacto de glifosato en el catabolismo del ácido *p*-cumárico y la nitrificación. El ácido *p*-cumárico y otros compuestos fenólicos relacionados, derivados de la degradación de la descomposición de residuos vegetales, pueden inhibir la oxidación del amonio a nitrato (Turtura *et al.*, 1989).

7. Conclusiones

En este trabajo se reportan por primera vez los efectos de aplicaciones repetidas de glifosato (tanto ingrediente activo como formulado comercial) en comunidades microbianas de suelos con y sin historia del herbicida. Las diferencias de abundancia de genes indicadores entre microcosmos control y con tres aplicaciones no resultaron significativas, ni para la comunidad bacteriana total como así tampoco para un grupo especializado ecológicamente relevante (BOA). En cambio, se observaron diferencias significativas al considerar simultáneamente ambos valores de abundancia mediante la relación BOA:bacterias totales (abundancia relativa de BOA), a nivel de la estructura de la comunidad de BOA (DGGE) y en la respuesta respiratoria (cocientes respiratorios). La abundancia relativa de BOA en Mayor Buratovich (BUR) se incrementó luego de tres aplicaciones del FC en el sitio sin historia de glifosato (NH), mientras que disminuyó en una proporción similar en el sitio con historia (H). El RQ con ácido *p*-cumárico, un compuesto fenilpropanoide relacionado con la degradación de la lignina en el suelo, resultó afectado en comunidades microbianas de ambos sitios. Se detectaron incrementos luego de tres aplicaciones, tanto para el IA (BUR_{NH}, BUR_H y ZAV_H) como para el FC (BUR_{NH}, únicamente). De manera similar, la estructura de la comunidad de BOA mostró modificaciones luego de tres aplicaciones. Al comparar microcosmos control y aquellos con tres aplicaciones, se observaron valores más bajos de similitud para el FC que para el IA, tanto en BUR_{NH} como en BUR_H. Los resultados fisiológicos y moleculares revelan un impacto de aplicaciones repetidas de glifosato en grupos microbianos involucrados en procesos clave para el ciclado del C y el N en el suelo. Finalmente, los resultados de este trabajo sugieren la necesidad de investigar la existencia de una posible relación entre el impacto de glifosato en el catabolismo del ácido *p*-cumárico y la inhibición biológica de la nitrificación.

CAPÍTULO 3

INTERACCIÓN ENTRE EXPOSICIÓN A GLIFOSATO Y DESECACIÓN- HUMEDECIMIENTO COMO FACTORES DE PERTURBACIÓN DE COMUNIDADES MICROBIANAS DEL SUELO

1. Introducción

Como se mencionó en la Introducción General y en el Capítulo 1, la detección de una respuesta PICT en comunidades microbianas de suelos expuestos crónicamente a un contaminante podría indicar la existencia de diferencias en la estructura y/o función de las comunidades. Asimismo, también se mencionó que la aclimatación o adaptación a agentes ambientales que perturban el sistema puede conllevar un costo relacionado con el incremento de la susceptibilidad a otros estreses o disturbios (Clements y Rohr, 2009). Una mayor sensibilidad a disturbios secundarios en suelos con tolerancia incrementada reforzaría entonces la existencia de un proceso de modificación gradual de las comunidades microbianas proporcionando más evidencias de cambio. Este fenómeno, observado en diversos estudios (Wilson, 1988; Levinton *et al.*, 2003; Gallently *et al.*, 2007), se conoce como “costo de tolerancia” (Clements y Rohr, 2009).

De acuerdo con la hipótesis de condicionamiento (*community-conditioning hypothesis*), los efectos de alteración de las comunidades pueden perdurar durante un largo tiempo luego de que el contaminante ha sido degradado o removido. Así como la estructura genética refleja la historia de las poblaciones a lo largo del tiempo evolutivo, las comunidades también preservan su historia particular, incluyendo las incidencias de exposiciones químicas previas (Clements y Rohr, 2009). En un estudio realizado en el año 2001, se concluyó que la reducción en la diversidad catabólica y la modificación en las propiedades del suelo debido a un uso intensivo del mismo, pueden reducir la resistencia de las comunidades microbianas a estreses o disturbios (Degens *et al.*, 2001). En el Capítulo 1 de esta Tesis se determinó que los suelos de Zavalla con y sin historia de exposición a glifosato no presentaban diferencias significativas en la abundancia ni en la estructura (DGGE) de la comunidad bacteriana, mientras que la diversidad catabólica (evaluada a través de la equitatividad de uso de sustratos carbonados) no resultó inferior en el sitio con historia. Asimismo, tampoco se detectó una respuesta PICT, es decir, una tolerancia incrementada a glifosato en suelos expuestos crónicamente respecto de suelos sin historia. Estas observaciones sugieren que una forma de complementar y apoyar los resultados del estudio PICT es estudiar si la aplicación de glifosato influye o no en la sensibilidad de las

CAPÍTULO 3

comunidades a ciertos factores de disturbio o estrés. Entre ellos es posible mencionar, por ejemplo, los ciclos de desecación-humedecimiento, recurrentes en el ambiente edáfico (Fierer *et al.*, 2003). La desecación puede afectar las comunidades microbianas mediante la limitación nutricional, el estrés osmótico y la competencia por nutrientes imponiendo una condición desfavorable para las comunidades microbianas (Griffiths *et al.*, 2003; Drenovsky *et al.*, 2014b). De la misma manera, el rápido re-humedecimiento del suelo puede provocar un *shock* osmótico induciendo la lisis celular, la liberación de solutos intracelulares y un incremento en la mineralización del N y del C (Fierer *et al.*, 2003). La interacción entre glifosato y desecación-humedecimiento no ha sido estudiada hasta el momento, a pesar de que la exposición a ambos factores podría ser cada vez más frecuente en el largo plazo teniendo en cuenta la intensificación de los sistemas de producción basados en cultivos GR (Cerdeira y Duke, 2006) y los cambios climáticos (Huntington, 2006). Por lo tanto, su abordaje reviste una particular importancia, no sólo en el contexto de esta Tesis como una complementación teórica y metodológica de los resultados del Capítulo 1, sino también considerando la relevancia que revisten estos factores de disturbio en agroecosistemas de la región en el largo plazo. El análisis fisiológico mediante la determinación de un cociente respiratorio (RQ) análogo al qCO_2 ($RQ = RB/SIR$; Cheng *et al.*, 1996; Dilly, 2005; Zabaloy *et al.*, 2016b) permite conocer el estado de las comunidades microbianas en el momento actual de exposición a determinadas perturbaciones, indicando si existe una situación metabólicamente desfavorable como consecuencia de la sensibilidad a dichos factores (Dilly, 2005), aspecto discutido en el Capítulo 2. Al mismo tiempo, cada estrés o disturbio en particular podría afectar en mayor o en menor medida a determinados grupos microbianos ecológicamente relevantes dependiendo de la naturaleza de la perturbación introducida. En el caso de desecación-humedecimiento y glifosato, tanto los microorganismos oxidantes del amonio (BOA como AOA) como así también el filo *Actinobacteria* representan grupos microbianos particularmente importantes como indicadores en función de su sensibilidad. En el primer caso debido a que son especialmente sensibles a diferentes pesticidas (Chang *et al.*, 2001; Feld *et al.*, 2015); como así también a la disponibilidad de agua (Gleeson *et al.*, 2010). Los ciclos de desecación-humedecimiento pueden afectar la actividad nitrificante, tanto positiva (Fierer y Schimel, 2002) como negativamente (Franzluebbers *et al.* 1995), como así también la estructura de la comunidad de BOA (Hastings *et al.*, 2000; Gleeson *et al.*, 2008). En el caso del filo *Actinobacteria* presenta una alta abundancia en el suelo donde desempeña un rol clave en la descomposición de la materia orgánica, siendo especialmente tolerante a la desecación y de mayor resistencia al humedecimiento rápido dada las características de su pared celular (LeBlanc *et al.*, 2008). Por lo tanto, no debería esperarse

un efecto significativo del ciclo de desecación-humedecimiento en la abundancia de *Actinobacteria* a menos que la aplicación inicial de glifosato afectara a la comunidad incrementando la sensibilidad de este filo bacteriano al disturbio de desecación-humedecimiento. En base a esta consideración y a la importancia de *Actinobacteria* como indicador (Introducción General, Sección 4.6.2), el estudio también abordará la evaluación de este grupo en conjunto con BOA y AOA.

De esta manera, se complementarán los resultados observados en el capítulo anterior para la localidad de ZAV, mediante un análisis fisiológico de comunidades microbianas provenientes de los mismos sitios H y NH, expuestas a un ciclo de desecación-humedecimiento bajo condiciones de laboratorio. Asimismo, mediante métodos moleculares se estudiarán las respuestas de las comunidades en el corto plazo cuando se ven expuestas inicialmente a glifosato y luego al disturbio de desecación-humedecimiento de manera de determinar si existe una interacción que condicione dicha respuesta.

2. Objetivos específicos

- Evaluar la respuesta fisiológica de comunidades microbianas frente a un factor de disturbio (desecación-humedecimiento) en microcosmos de suelos con y sin historia del herbicida a campo.
- Analizar las modificaciones en la comunidad bacteriana y en grupos específicos (BOA, AOA, *Actinobacteria*) frente a la exposición aguda a glifosato y a desecación-humedecimiento. Determinar si existe interacción entre los efectos de ambos factores.

3. Hipótesis

Desde un abordaje estrictamente teórico, se esperaría una menor resistencia a perturbaciones si el uso continuado del herbicida modificara la diversidad catabólica y/o la estructura de la comunidad microbiana edáfica. No obstante, en base al resultado central del Capítulo 1 (ausencia de respuesta PICT) no debería observarse un “costo de tolerancia” frente a la aplicación de un factor de disturbio, por ejemplo, frente a un ciclo de desecación-humedecimiento. En relación a ello, se predice que las respuestas fisiológicas de las comunidades microbianas a desecación-humedecimiento serán similares en los sitios H y NH. Asimismo, considerando que no existiría un “costo de tolerancia”, la exposición aguda a glifosato a través de una única aplicación no condicionaría la respuesta a desecación-humedecimiento, por lo que no se observaría interacción entre los efectos de la aplicación

de glifosato y de desecación-humedecimiento para ninguno de los grupos microbianos evaluados (bacterias totales, *Actinobacteria*, BOA y AOA).

4. Materiales y métodos

4.1 Sitio de estudio y muestreo

El muestreo fue realizado en el mes de Mayo de 2015 en la localidad de Zavalla, en los mismos sitios con (H) y sin historia (NH) de glifosato que los descriptos anteriormente en la Sección 4.1.1 del Capítulo 1 para esta localidad. En un área de 25 x 25 m² se tomaron 15 submuestras a una profundidad 0-10 cm con pala corta de mano, se tamizaron (<5,6 mm) y mezclaron de manera homogénea para obtener una muestra compuesta que se mantuvo refrigerada a 4°C por seis días y con la que se prepararon microcosmos.

4.2 Diseño del experimento y preparación de microcosmos

Se diseñó un experimento factorial completamente aleatorizado utilizando microcosmos preparados a partir del suelo muestreado de sitios H y NH. Los dos factores considerados fueron “Glifosato” y “Desecación-humedecimiento”, cada uno con dos niveles: con (CG) y sin (SG) aplicación de glifosato; con (CD) y sin (SD) aplicación de desecación-humedecimiento. De esta manera, considerando las cuatro combinaciones posibles de los dos niveles de ambos factores y tres réplicas para cada combinación ($n=3$), se trabajó en total con 12 microcosmos del suelo NH y 12 microcosmos del suelo H. Los tratamientos evaluados, definidos por la combinación de niveles de los dos factores, fueron designados de la siguiente manera: SD/SG (sin desecación-humedecimiento / sin glifosato); SD/CG (sin desecación-humedecimiento / con glifosato); CD/SG (con desecación-humedecimiento / sin glifosato); CD/CG (con desecación-humedecimiento / con glifosato).

Los microcosmos se prepararon en viales de plástico de 100 ml con tapa a rosca en los que se colocaron 40 g de suelo húmedo (60% de su Cc) (Degens *et al.*, 2001). Para el tratamiento con glifosato se utilizó Roundup Full II (IA: sal de potasio 66,2% P/V, Monsanto™, aditivos no especificados) a una dosis de 49 µg de IA g⁻¹ suelo, según la dosis empleada en estudios similares (Haney *et al.*, 2000; Ratcliff *et al.*, 2006; Lancaster *et al.*, 2009) y al igual que la utilizada en el Capítulo 2 (Sección 4.2) (Allegri *et al.*, 2017). El ciclo de desecación-humedecimiento consistió en desecación del suelo mediante circulación forzada de aire (ventilación constante a 0,5 m de distancia) desde la parte superior de los microcosmos (inclinación aproximada: 45°) durante 24 hs, a temperatura ambiente, seguida de re-humedecimiento hasta un 60% de la Cc.

Antes de comenzar con el ensayo se realizó una pre-incubación de siete días a 25°C, tras la cual se aplicó en primera instancia el herbicida en seis microcosmos (CG) en un volumen final de 2 ml e igual volumen de agua destilada estéril en otros seis (SG). La humedad fue ajustada inmediatamente a un 60% de su Cc en todos los microcosmos con agua destilada estéril. A los 14 días, se aplicó el disturbio desecación-humedecimiento en algunos microcosmos (CD) mientras que en otros (SD) sólo se aplicó agua destilada estéril (60% Cc). La toma de submuestras para medidas de respiración de la comunidad microbiana y para análisis moleculares se realizó 14 días después de la aplicación del tratamiento de desecación (en el caso de tratamientos CD) o de la aplicación de agua destilada estéril (en el caso de tratamientos SD). Los microcosmos se incubaron utilizando, al igual que para la pre-incubación, una incubadora Ingelab modelo I.501 PF a 25±1°C y en oscuridad. Los ajustes de humedad se realizaron semanalmente mediante registro del peso inicial de los microcosmos y compensación con agua destilada estéril de acuerdo al peso registrado en cada momento.

Es importante destacar que en este estudio transcurrieron 14 días entre la aplicación inicial de glifosato en el microcosmo y la imposición del disturbio de desecación-humedecimiento. A partir de allí, transcurrieron otros 14 días hasta el muestreo final. Este período de tiempo se seleccionó en base a lo sugerido por Degens *et al.* (2001) para la aplicación de diversos tipos de disturbio en microcosmos, considerando que debe permitirse un tiempo de estabilización y recuperación de las comunidades microbianas y de descomposición del C orgánico liberado por la muerte de microorganismos. Asimismo, la imposición inmediata del ciclo de desecación-humedecimiento luego de la aplicación del herbicida, sin un lapso mínimo de recuperación de la comunidad, superpondría brusca y forzosamente los efectos de ambos disturbios. De manera similar, el acortamiento del período de tiempo hasta el muestreo final forzaría la detección de diferencias al reducir la probabilidad de que el sistema se equilibre y retorne a una condición similar a la condición pre-disturbio. El objetivo de este estudio fue determinar si los indicadores microbiológicos mostraban diferencias entre tratamientos aun cuando las condiciones permitieran la recuperación hasta el momento del muestreo. En dicho caso, si aún así se detectaran diferencias, las mismas indicarían una relativa sensibilidad de la comunidad a los tratamientos impuestos, no forzada experimentalmente.

4.3 Análisis de respiración de la comunidad microbiana

Las medidas de respiración (SIR y RB) y el procesamiento de los datos se realizaron utilizando el mismo procedimiento descripto en la Sección 4.3 del Capítulo 2 utilizando el

CAPÍTULO 3

sistema sensor de oxígeno BDOBS. Se evaluaron todos los tratamientos mencionados anteriormente para ambos sitios (H y NH).

4.4 *Análisis molecular de comunidades microbianas*

Para el análisis molecular se evaluaron únicamente los microcosmos correspondientes al suelo con historia de glifosato (H), como se indica en la Tabla 12.

Tabla 12. Muestras analizadas mediante métodos moleculares. Todas las muestras corresponden a microcosmos del suelo agrícola con historia de exposición a glifosato (H). Se indica la designación adoptada para cada una de ellas en los diferentes análisis. Letras minúsculas (a, b, c) luego del tratamiento indican réplicas diferentes.

Muestras	Tratamiento	Desecación-humedecimiento	Glifosato
SD/SG_a	SD/SG	Sin (SD)	Sin (SG)
SD/SG_b	SD/SG	Sin (SD)	Sin (SG)
SD/SG_c	SD/SG	Sin (SD)	Sin (SG)
SD/CG_a	SD/CG	Sin (SD)	Con (CG)
SD/CG_b	SD/CG	Sin (SD)	Con (CG)
SD/CG_c	SD/CG	Sin (SD)	Con (CG)
CD/SG_a	CD/SG	Con (CD)	Sin (SG)
CD/SG_b	CD/SG	Con (CD)	Sin (SG)
CD/SG_c	CD/SG	Con (CD)	Sin (SG)
CD/CG_a	CD/CG	Con (CD)	Con (CG)
CD/CG_b	CD/CG	Con (CD)	Con (CG)
CD/CG_c	CD/CG	Con (CD)	Con (CG)

4.4.1 *PCR cuantitativa de bacterias totales, Actinobacteria, BOA y AOA*

La extracción y cuantificación del ADN de los microcosmos, previa a la qPCR, se llevó a cabo utilizando el kit comercial indicado en la Sección 4.4 del Capítulo 2, siguiendo las especificaciones del fabricante.

En el caso de bacterias totales la cuantificación mediante qPCR se llevó a cabo de la misma manera que la indicada en el Capítulo 1 (Sección 4.4.2), mientras que para BOA se siguió el mismo procedimiento descrito en el Capítulo 2 (Sección 4.4.1).

Para la cuantificación de AOA se utilizó el par de cebadores amoA19F y CrenamoA616r48x (Tabla 13) que amplifican un producto de 624 pb del gen *amoA* de AOA (*amoA_{AOA}*). La composición de la mezcla de reacción fue la siguiente: 7,5 µl de PCR iTaq Universal SYBR Green Supermix (2x; Bio-Rad Laboratories), 0,9 µl de cada cebador (soluciones madre 10 µM, Invitrogen), 1 µl de ADN molde (~1–10 ng µl⁻¹) y agua ultrapura en cantidad suficiente para 15 µl. El programa de amplificación fue el siguiente: pre-incubación (95°C, 5 min, 1 ciclo), amplificación (95 °C 20 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45s, 40 ciclos), seguido de un análisis de las curvas de fusión para verificar la especificidad (65–95 °C) en un equipo de PCR en tiempo real ABI 7500 Real Time System (Applied Biosystems,

CAPÍTULO 3

Foster City, CA). Se utilizó un estándar preparado según Zabaloy *et al.* (2017). Para ello, previo a la qPCR, se llevó a cabo una amplificación con el protocolo mencionado anteriormente pero utilizando ADN extraído de una muestra de suelo agrícola. El amplicón resultante fue ligado en un plásmido pJet 1.2/blunt utilizando el kit comercial CloneJet PCR Cloning kit (Fermentas, Vilnius, Lituania) y a continuación se transformaron células químicamente competentes de *E. coli* DH5α. Un clon fue enviado a MacroGen Korea mostrando una identidad del 100% en la base de datos del GenBank con una secuencia del gen *amoA* de una cepa de arquea no cultivada (JQ406893.1). El ADN plasmídico fue extraído utilizando el kit comercial Ultra Clean Standard Mini Plasmid Prep kit (MoBio), linealizado con la enzima *HindIII* y cuantificado utilizando un fluorómetro Quantus (Promega) junto con el kit Quanti Fluor ds DNA (Promega). La curva estándar fue preparada mediante diluciones decimales seriadas del plásmido con el inserto (entre 10² y 10⁶ copias).

Por su parte, para estudiar la abundancia de *Actinobacteria* se utilizó el par de cebadores S-P-Acti-1154-a-S-19 y S-P-Acti-1339-a-A-18 (Tabla 13) que amplifican el gen del ARNr 16S de *Actinobacteria* (ARNr 16S_{Actinobacteria}), los cuales han sido diseñados recientemente para este grupo taxonómico por Pfeiffer *et al.* (2014) y no se ven afectados por problemas encontrados con otros cebadores previamente diseñados para el mismo taxón (Fierer *et al.*, 2005). Los cebadores muestran una sustancial mejora en la especificidad y fueron diseñados en base a secuencias de referencia del gen correspondiente al ARNr 16S presentes en la base de datos SILVA (Pfeiffer *et al.*, 2014). El tamaño del producto amplificado por estos cebadores es de 166 pb.

Tabla 13. Cebadores utilizados para PCR cuantitativa (qPCR) de arqueas oxidantes del amoníaco (AOA) y de *Actinobacteria*.

Cebadores	Secuencia (5' – 3')	Especificidad	Referencia
amoA19F	ATGGTCTGGCTWAGACG	AOA	Leininger <i>et al.</i> (2006)
CrenamoA616r48x	GCCATCCABCKRTANGTCCA		Schauss <i>et al.</i> (2009)
P-Acti-1154-a-S-19	GRDACYGCCGGGGTYAACT	<i>Actinobacteria</i>	Pfeiffer <i>et al.</i> (2014)
S-P-Acti-1339-a-A-18	TCWGCGATTACTAGCGAC		

La composición de la mezcla de reacción fue la siguiente: 7,5 µl de PCR iTaq Universal SYBR Green Supermix (2x; Bio-Rad Laboratories), 0,3 µl de cada cebador (soluciones madre 10 µM, Invitrogen), 1 µl de ADN molde (~1–10 ng µl⁻¹) y agua ultrapura en cantidad suficiente para 15 µl. El programa de amplificación se llevó a cabo de la siguiente manera: pre-incubación (95°C, 5 min, 1 ciclo), amplificación (95°C 15 s, 59°C 30 s, 72°C 45 s, 35

ciclos), seguido de un análisis de las curvas de fusión (65–95 °C), en el mismo equipo de PCR en tiempo real antes mencionado. Como estándar para la cuantificación se utilizó ADN genómico de *Streptomyces albus* DSM 40313 (diluido serialmente para obtener entre $4,97 \cdot 10^6$ y $4,97 \cdot 10^2$ copias del gen).

4.4.2 PCR-DGGE de BOA

Los procedimientos utilizados para la amplificación por PCR y para la separación electroforética fueron los mismos que los descritos anteriormente en el Capítulo 2 (Sección 4.4.2). Se utilizó el software GelComparTM II v. 4.6 tanto para los ajustes de la imagen del gel como para el análisis estadístico del mismo.

4.5 Análisis estadístico

Los valores de los cocientes respiratorios (RQ) obtenidos en los distintos tratamientos fueron analizados estadísticamente mediante un ANOVA de dos factores a un nivel de significación del 5%, utilizando el software estadístico R v3.0.2 (R Development Core Team, 2013). Los datos de abundancia (número de copias) de los genes estudiados fueron expresados en forma logarítmica y analizados de la misma manera. En todos los casos los supuestos de normalidad y homocedasticidad fueron verificados mediante el test de Shapiro-Wilks modificado y el test de Levene, respectivamente ($\alpha=0,05$). Asimismo, se realizaron comprobaciones gráficas de normalidad (QQ-plot), de homocedasticidad (residuos vs predichos) y de interacción de los factores estudiados.

El análisis de componentes principales (ACP) integrando los datos de abundancia de genes indicadores [\log_{10} (copias gen ARNr 16S_{Actinobacteria}); \log_{10} (copias *amoA*_{BOA}); \log_{10} (copias *amoA*_{AOA})] y el cociente respiratorio con ácido *p*-cumárico (RQ_{Ácido *p*-cumárico}) para los distintos tratamientos (datos no estandarizados) se llevó a cabo utilizando el paquete FactoMineR del software estadístico R (Husson y Mazet, 2007). La homogeneidad de variancias multivariada entre los tratamientos se verificó mediante el procedimiento *betadisper* empleando un test de permutación ($\alpha=0,05$) para evaluar la significancia del modelo (999 permutaciones). Por otro lado, se recurrió a un análisis multivariado de la variancia no paramétrico (NPMANOVA) usando matrices de distancia Euclidea (a un nivel de significación del 5%) para estudiar la significancia estadística de los efectos de ambos factores como así también de la interacción. Para estos análisis se utilizó el paquete VEGAN (Oksanen, 2015) del software estadístico R.

5. Resultados

5.1 Análisis fisiológico de comunidades microbianas

En la Figura 20 se encuentran representadas las medias de los RQ de cada sustrato para los diferentes tratamientos. De acuerdo con el ANOVA de dos factores (Tablas 14 y 15), no se detectó interacción significativa entre ambos factores en ninguno de los dos sitios (con y sin historia) con ninguno de los tres sustratos evaluados ($P>0,05$). Los efectos principales tampoco resultaron significativos, a excepción del sitio H donde el RQ del ácido *p*-cumárico ($RQ_{\text{Ácido } p\text{-cumárico}}$) presentó significancia estadística para el factor principal glifosato ($P<0,05$). En este caso, el RQ en microcosmos con glifosato (CG) fue un 21,3% mayor respecto de microcosmos sin el herbicida (SG).

Tabla 14. Análisis de la variancia (ANOVA) para los cocientes respiratorios (RQ) obtenidos con cada uno de los tres sustratos evaluados (fenilalanina, manosa y ácido *p*-cumárico) en el sitio sin historia de glifosato (NH). Se indican los valores de probabilidad asociada para los efectos principales del factor glifosato (G) y desecación-humedecimiento (D), como así también para la interacción (D×G). *gl*: grados de libertad. Valores de $P<0,05$ indican significancia estadística.

SIN HISTORIA (NH)			
ANOVA	$RQ_{\text{Fenilalanina}}$	RQ_{Manosa}	$RQ_{\text{Ácido } p\text{-cumárico}}$
D (<i>gl</i> =1)	$P=0,37$	$P=0,19$	$P=0,41$
G (<i>gl</i> =1)	$P=0,83$	$P=0,31$	$P=0,33$
D×G (<i>gl</i> =1)	$P=0,30$	$P=0,89$	$P=0,63$
<i>gl</i> error	8	8	8

Tabla 15. Análisis de la variancia (ANOVA) para los cocientes respiratorios (RQ) obtenidos con cada uno de los tres sustratos evaluados (fenilalanina, manosa y ácido *p*-cumárico) en el sitio con historia de glifosato (H). Se indican los valores de probabilidad asociada para los efectos principales del factor glifosato (G) y desecación-humedecimiento (D), como así también para la interacción (D×G). *gl*: grados de libertad. Valores de $P<0,05$ indican significancia estadística.

CON HISTORIA (H)			
ANOVA	$RQ_{\text{Fenilalanina}}$	RQ_{Manosa}	$RQ_{\text{Ácido } p\text{-cumárico}}$
D (<i>gl</i> =1)	$P=0,27$	$P=0,98$	$P=0,37$
G (<i>gl</i> =1)	$P=0,09$	$P=0,18$	$P=0,041$
D×G (<i>gl</i> =1)	$P=0,52$	$P=0,53$	$P=0,92$
<i>gl</i> error	8	8	8

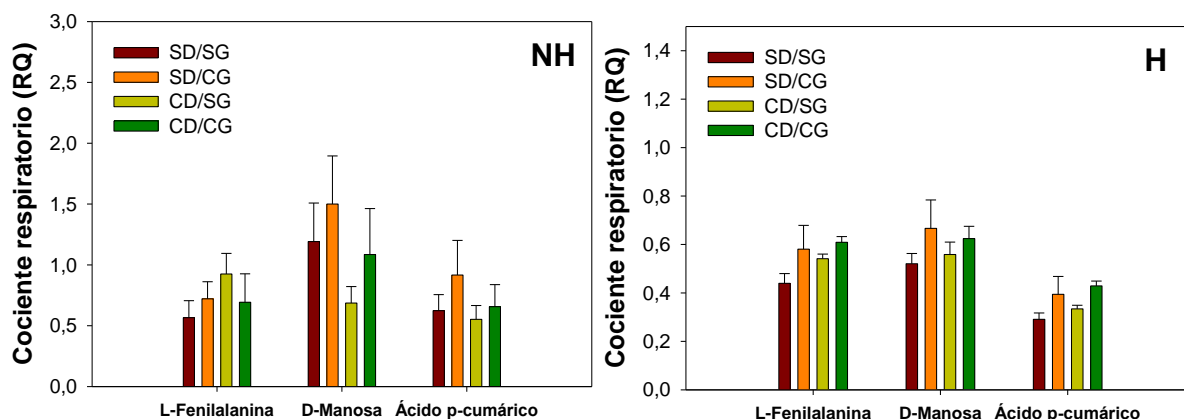


Figura 20. Cocientes respiratorios (RQ) obtenidos con cada uno de los tres sustratos evaluados. El cociente corresponde a la relación entre la respiración basal (RB) y la respiración inducida (SIR). Se presentan los resultados para los cuatro tratamientos en los sitios con (H) y sin (NH) historia de glifosato. Las barras de error corresponden al error estándar de la media ($n=3$). **SD/SG**: Sin desecación-humedecimiento/Sin glifosato; **SD/CG**: Sin desecación-humedecimiento/Con glifosato; **CD/SG**: Con desecación-humedecimiento/Sin glifosato; **CD/CG**: Con desecación-humedecimiento/Con glifosato.

5.2 Análisis molecular de comunidades microbianas

5.2.1 Abundancia de bacterias totales, Actinobacteria, BOA y AOA

Las ecuaciones obtenidas del ajuste lineal de las curvas estándar, que describen relación entre los valores de C_t y el número de copias de cada gen indicador, fueron las siguientes:

$C_t = 38,19 - 3,56 \log_{10} (n^\circ \text{ copias})$ para el gen del ARNr 16S de *Eubacteria* ($R^2 = 0,99$);

$C_t = 41,21 - 3,76 \log_{10} (n^\circ \text{ copias})$ para el gen *amoA*_{BOA} ($R^2 = 0,99$);

$C_t = 38,19 - 3,56 \log_{10} (n^\circ \text{ copias})$ para el gen *amoA*_{AOA} ($R^2 = 0,99$);

$C_t = 38,17 - 3,48 \log_{10} (n^\circ \text{ copias})$ para el gen del ARN 16S_{Actinobacteria} ($R^2 = 0,99$).

Las eficiencias de la qPCR fueron: 91,07% para el gen del ARNr 16S (*Eubacteria*); 93,67% para el gen del ARN 16S_{Actinobacteria}; 84,1% para el gen *amoA*_{BOA} y 78,57% para el gen *amoA*_{AOA}.

En la Figura 21 se encuentran representados los valores de abundancia estimados mediante qPCR para los genes indicadores de los diferentes grupos microbianos en los diferentes tratamientos. Los resultados del ANOVA de dos factores para cada uno de estos grupos se encuentran indicados en la Tabla 16. Se observó significancia estadística del efecto principal desecación-humedecimiento únicamente en el caso de BOA ($P < 0,05$). Por su parte, los efectos de la interacción y del factor glifosato no resultaron significativos en ningún caso (Tabla 16). La abundancia de BOA (promediada para todos los niveles del factor glifosato) fue un 26,6% mayor en presencia del disturbio por desecación-humedecimiento que en ausencia del mismo (Anexo III, Tabla 51). En la Tabla 52 del Anexo

CAPÍTULO 3

III se indica la abundancia de BOA en microcosmos con y sin glifosato promediada para ambos niveles del factor desecación-humedecimiento.

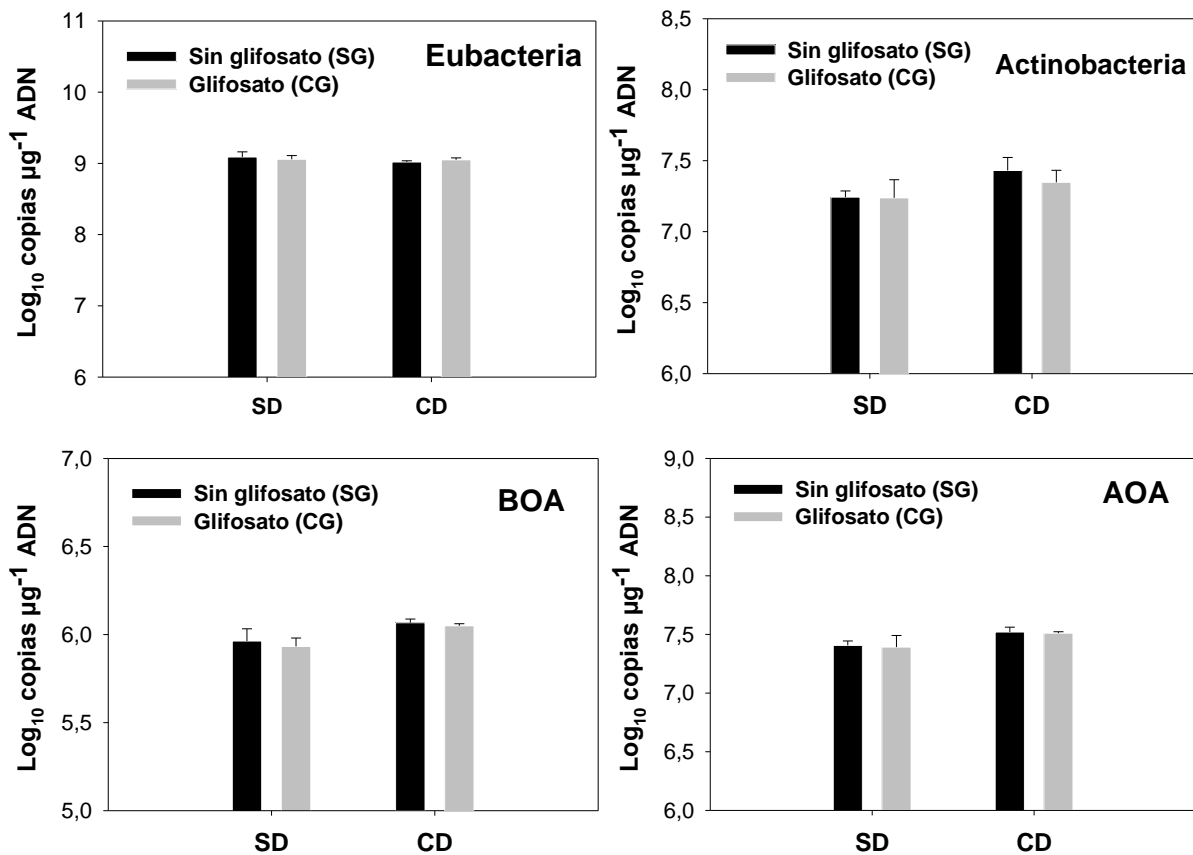


Figura 21. Número de copias de los distintos genes cuantificados por qPCR para bacterias totales, *Actinobacteria*, bacterias oxidantes del amoníaco (BOA) y arqueas oxidantes del amoníaco (AOA). Los valores fueron referidos a la cantidad de ADN en las muestras (µg). Se presentan los resultados para los cuatro tratamientos evaluados: **SD/SG**: Sin desecación-humedecimiento/Sin glifosato; **SD/CG**: Sin desecación-humedecimiento/Con glifosato; **CD/SG**: Con desecación-humedecimiento/Sin glifosato; **CD/CG**: Con desecación-humedecimiento/Con glifosato. Las barras de error corresponden al error estándar de la media ($n=3$).

Tabla 16. Análisis de la variancia (ANOVA) para el número de copias de genes indicadores de los distintos grupos microbianos. Se indican los valores de probabilidad asociada para cada efecto principal: glifosato (G) y desecación-humedecimiento (D) como así también para la interacción (D×G). *gl*: grados de libertad. Valores de $P<0,05$ indican significancia estadística.

ANOVA	Bacterias totales	<i>Actinobacteria</i>	BOA	AOA
D (<i>gl</i> =1)	$P=0,44$	$P=0,15$	$P=0,036$	$P=0,078$
G (<i>gl</i> =1)	$P=0,97$	$P=0,64$	$P=0,59$	$P=0,84$
D×G (<i>gl</i> =1)	$P=0,52$	$P=0,68$	$P=0,88$	$P=0,97$
<i>gl</i> error	8	8	8	8

CAPÍTULO 3

En función de lo observado en el Capítulo 2, donde se detectaron diferencias significativas entre tratamientos utilizando la abundancia relativa de BOA como indicador (BOA:bacterias totales), se realizó también un ANOVA de dos factores utilizando la abundancia relativa (AR) de cada grupo microbiano (BOA y *Actinobacteria*). Los resultados se indican en la Tabla 17 mientras que las medias de AR se detallan en las Tablas 53 y 54 del Anexo III.

Tabla 17. Análisis de la variancia (ANOVA) para la abundancia relativa (AR) de bacterias oxidantes del amoníaco (BOA), de *Actinobacteria* y de la relación entre arqueas oxidantes del amoníaco (AOA) y BOA. Se indican los valores de probabilidad asociada para cada efecto principal: glifosato (G) y desecación-humedecimiento (D) y para la interacción de factores (DxG). *gl*: grados de libertad. Valores de $P < 0,05$ indican significancia estadística.

ANOVA	AR _(BOA)	AR _(Actinobacteria)	AOA:AOB
D (<i>gl</i> =1)	$P=0,031$	$P=0,14$	$P=0,89$
G (<i>gl</i> =1)	$P=0,70$	$P=0,72$	$P=0,79$
DxG (<i>gl</i> =1)	$P=0,67$	$P=0,55$	$P=0,92$
<i>gl error</i>	8	8	8

Los resultados del ANOVA para la abundancia relativa de BOA y de *Actinobacteria* fueron similares a los observados para la abundancia absoluta: no se observó interacción significativa en ninguno de los dos casos ($P > 0,05$) (Tabla 17). El efecto principal de desecación-humedecimiento sólo fue significativo para BOA, mientras que el efecto del factor glifosato no presentó significancia estadística. De la misma manera, la abundancia de AOA relativa a BOA tampoco mostró significancia estadística para la interacción y para los efectos principales ($P > 0,05$) (Tabla 17).

5.2.2 Estructura de la comunidad de BOA

Como se observa en la Figura 22, los perfiles de DGGE de BOA mostraron muy pocas bandas y los valores de similitud (Pearson) fueron altos entre muestras con diferentes tratamientos. No se observó separación de los cuatro tratamientos en cuatro *clusters* diferentes. Tampoco se observó una separación obvia entre los dos niveles del factor desecación-humedecimiento (CD y SD) o entre los dos niveles del factor glifosato (CG y SG). No obstante, a un 80% de similitud (*cut-off*), el análisis basado en perfiles densitométricos (Pearson-UPGMA) indicó una separación en dos *clusters* (Figura 22, ramas grises), uno de los cuales contiene a las tres réplicas del tratamiento con desecación-humedecimiento y con glifosato (CD/CG) mientras que el otro contiene a dos de las réplicas

que también recibieron desecación-humedecimiento pero no glifosato (CD/SG). Las primeras (CD/CG) integran un mismo *cluster* junto con las muestras que no recibieron desecación-humedecimiento (SD).

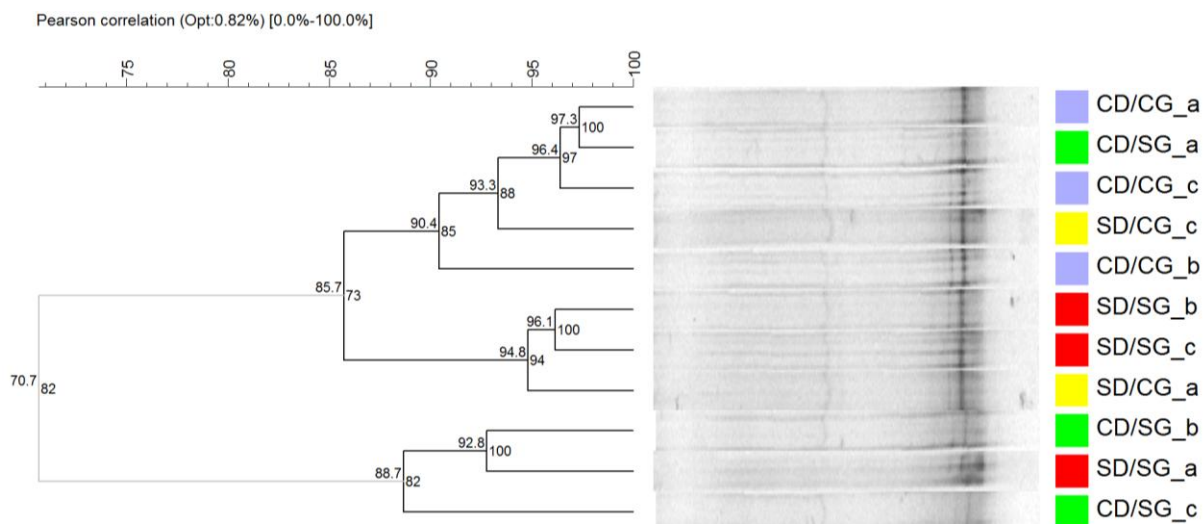


Figura 22. Análisis de agrupamiento de perfiles electroforéticos de bacterias oxidantes del amoníaco (BOA) en microcosmos del sitio con historia (H) con diferentes tratamientos. Los perfiles se obtuvieron mediante electroforesis en gradiente de desnaturalizante (DGGE). El dendrograma corresponde al análisis de agrupamientos basado en perfiles densitométricos utilizando el coeficiente de correlación producto-momento de Pearson (r) y el algoritmo UPGMA. Los tratamientos se encuentran indicados con diferentes colores. **SD/SG**: Sin desecación-humedecimiento/Sin glifosato; **SD/CG**: Sin desecación-humedecimiento/Con glifosato; **CD/SG**: Con desecación-humedecimiento/Sin glifosato; **CD/CG**: Con desecación-humedecimiento/Con glifosato. Las letras en minúscula en el rótulo indican las réplicas de cada tratamiento. En cada nodo, el número izquierdo indica el valor de similitud ($r \times 100$), mientras que el número derecho corresponde al coeficiente de correlación cofenética. Las ramas en color gris señalan los agrupamientos con 100% estabilidad interna según el método Jackknife, definidos a un 80% de similitud.

5.3 Análisis integrado de datos fisiológicos y moleculares

Los datos de abundancia de *Actinobacteria*, BOA y AOA de cada uno de los microcosmos del suelo con historia fueron utilizados conjuntamente con los datos fisiológicos ($RQ_{\text{Ácido } p\text{-cumárico}}$) para llevar a cabo un ACP. Los resultados se encuentran representados gráficamente en las Figuras 23 y 24. Mediante este análisis fue posible explicar un 55% de la variancia total con la componente principal 1 (CP1, "Dim 1") y un porcentaje menor (23,97%) con la componente 2 (CP2, "Dim 2"). Por lo tanto, entre ambas explican un amplio porcentaje (aproximadamente un 80%) de la variancia total de los datos (junto con la CP3 explican un 94,75% de la variancia). Como se observa en la Figura 23, no existe una separación obvia de los cuatro tratamientos a lo largo de la CP1. En esta componente sólo se observa una separación entre muestras con (CD) y sin (SD) desecación-humedecimiento

CAPÍTULO 3

(elipses), aunque la separación no es completamente definida (superposición de elipses). El resultado del análisis NPMANOVA (Tabla 18) para el factor principal desecación-humedecimiento refleja esa separación marginal observada en el gráfico de la Figura 23 (elipses). En el caso del factor glifosato y de la interacción entre ambos factores los efectos no resultaron significativos ($P>0,05$, Tabla 18).

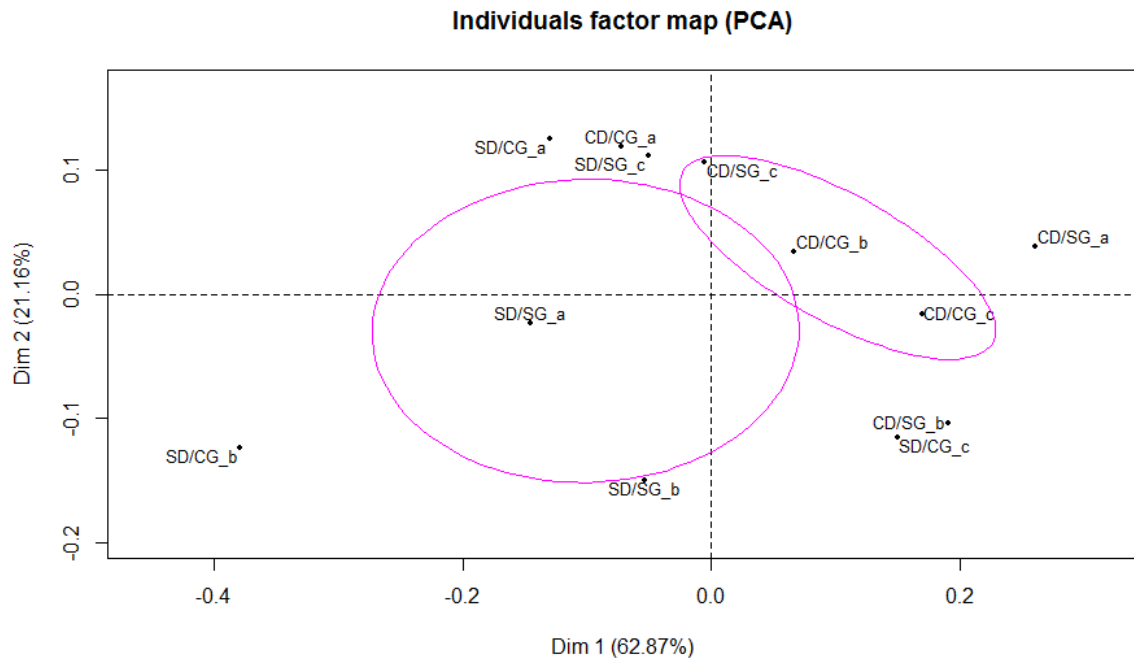


Figura 23. Análisis de componentes principales (ACP) de microcosmos del sitio con historia (H) bajo diferentes tratamientos. Se encuentran indicadas las elipses de 95% de confianza en torno a los baricentros correspondientes a las muestras con (CD) y sin (SD) desecación-humedecimiento. **SD/SG:** Sin desecación-humedecimiento/Sin glifosato; **SD/CG:** Sin desecación-humedecimiento/Con glifosato; **CD/SG:** Con desecación-humedecimiento/Sin glifosato; **CD/CG:** Con desecación-humedecimiento/Con glifosato. Las letras en minúscula al final (a, b, c) indican las réplicas de cada tratamiento.

Tabla 18. Análisis multivariado de la variancia no paramétrico (NPMANOVA) para el conjunto de datos fisiológicos y moleculares. El análisis se llevó a cabo con 10^4 permutaciones. Se indican los valores de probabilidad asociada para cada efecto principal: glifosato (G) y desecación-humedecimiento (D) y para la interacción de factores (D×G). *gl*: grados de libertad. Valores de $P<0,05$ indican significancia estadística.

NPMANOVA (ADONIS)	
D (<i>gl</i>=1)	$P=0,041$ ($F= 3,21$)
G (<i>gl</i>=1)	$P=0,50$ ($F= 0,82$)
D×G (<i>gl</i>=1)	$P=0,98$ ($F= 0,10$)
<i>gl</i> error	8

Las variables se encuentran representadas junto con las observaciones en el *biplot* de la Figura 24. La mayor contribución a la separación a lo largo de la CP1 se observó para

Actinobacteria mientras que BOA y AOA presentaron contribuciones similares entre sí y menores que *Actinobacteria*. La contribución de la variable fisiológica (RQ_{Ácido p-cumárico}) fue notablemente menor que las contribuciones de las abundancias (BOA, AOA y *Actinobacteria*) tanto en la CP1 como en la CP2 (Anexo III, Tabla 55).

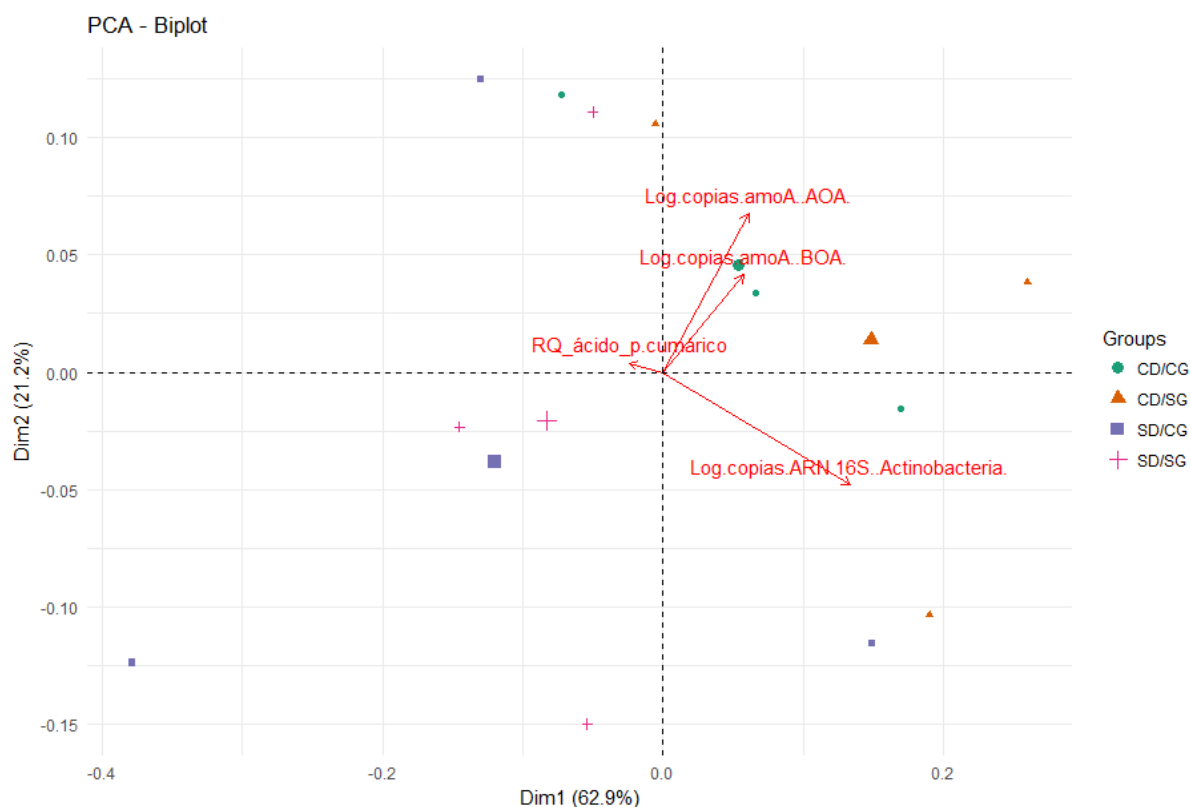


Figura 24. Biplot correspondiente al análisis de componentes principales (ACP) de microcosmos del sitio con historia (H) bajo diferentes tratamientos. Las observaciones para los cuatro tratamientos se indican con símbolos (leyenda de la derecha) mientras que las variables se indican en rojo. Los símbolos de mayor tamaño indican los centroides de cada tratamiento. **SD/SG:** Sin desecación-humedecimiento/Sin glifosato; **SD/CG:** Sin desecación-humedecimiento/Con glifosato; **CD/SG:** Con desecación-humedecimiento/Sin glifosato; **CD/CG:** Con desecación-humedecimiento/Con glifosato.

6. Discusión

La modificación gradual de las comunidades microbianas del suelo, como consecuencia de la presión de selección que puede ejercer un contaminante, conduce frecuentemente a una mayor tolerancia al compuesto químico (*Pollution Induced Community Tolerance*; Blanck *et al.*, 1988). Este incremento en la tolerancia, sin embargo, puede tener asociado un costo en la comunidad, modificándose la sensibilidad frente a diferentes disturbios o estreses secundarios a los que normalmente se enfrentan en el ambiente edáfico (Clements y Rohr, 2009; Azarbad *et al.*, 2016). El primer objetivo de este estudio fue determinar si las comunidades microbianas de suelos con larga historia de glifosato (H) y nunca expuestos

CAPÍTULO 3

(NH) resultaban afectadas por un ciclo de desecación-humedecimiento de modo de complementar los resultados de la estrategia PICT presentados en el Capítulo 1. Como segundo objetivo se propuso determinar si una única aplicación de glifosato en microcosmos podría tener influencia en la sensibilidad de la comunidad frente a un disturbio posterior (ciclo de desecación-humedecimiento). En condiciones de campo, la mayoría de los suelos atraviesan no uno, sino varios eventos de desecación-humedecimiento anuales (Fierer y Schimel, 2002). La disponibilidad de agua posee una notable influencia en el metabolismo y la supervivencia de los microorganismos del suelo. A diferencia de los hábitats acuáticos, las superficies presentes en los microhábitats del suelo experimentan cambios notorios en el contenido de agua, desde una saturación extrema hasta la aridez. Una fracción de la comunidad microbiana muere durante cada ciclo de desecación-humedecimiento. Como consecuencia de ello, la composición de la misma está sometida a fluctuaciones (Daniel, 2005), las cuales pueden afectar los procesos bioquímicos que ocurren en el suelo (Fierer y Schimel, 2002). Teniendo en cuenta la frecuencia con la que se presentan los ciclos de desecación-humedecimiento en los ecosistemas terrestres y la frecuencia cada vez mayor de aplicaciones de glifosato en la región Pampeana, el estudio de la interacción entre ambos factores y sus efectos sobre comunidades microbianas adquiere una especial relevancia.

Los resultados del análisis fisiológico indicaron que no existe interacción entre los efectos del ciclo de desecación-humedecimiento y de aplicación de glifosato sobre los RQ analizados, en ninguno de los dos sitios (H y NH). Como se comentó en el Capítulo 2, los incrementos en este parámetro se observan frente a situaciones desfavorables que requieren de una mayor energía de mantenimiento y por ende reflejan la sensibilidad de la comunidad microbiana a dicha condición (Dilly, 2005). La ausencia de interacción significativa sugiere que la aplicación de glifosato en microcosmos no condicionaría la sensibilidad a la perturbación posterior introducida por el ciclo de desecación-humedecimiento.

El comportamiento anterior es particularmente destacable dado que no difiere para microcosmos de los sitios H y NH. Si mediante la estrategia PICT (Capítulo 1) se hubiese detectado una tolerancia incrementada al formulado comercial en el sitio H, como resultado de la exposición crónica, entonces podría esperarse un “costo de tolerancia” (Clements y Rohr, 2009), es decir, una mayor sensibilidad a otros disturbios/estreses como desecación-humedecimiento. De esta manera, la ausencia de un efecto significativo del ciclo de desecación-humedecimiento sobre los RQ observados en ambos sitios (H y NH) sugiere que la sensibilidad a esta perturbación no diferiría entre suelos con diferente historia, en

CAPÍTULO 3

consistencia con los resultados observados anteriormente en el Capítulo 1 (resultado negativo para el ensayo PICT).

Otro parámetro que puede calcularse a partir del análisis fisiológico y que es sensible a estreses o disturbios es la equitatividad de uso de múltiples sustratos (Degens *et al.*, 2001). Sin embargo, dado que se analizaron sólo tres sustratos, se consideró más apropiado el cálculo y comparación de los RQ.

El análisis molecular mediante qPCR en microcosmos del sitio H proporcionó información similar a la obtenida a nivel fisiológico. En este caso tampoco se observó una interacción significativa entre la aplicación de glifosato y el disturbio por desecación-humedecimiento, para ninguno de los grupos microbianos analizados, resultado similar al mencionado anteriormente para los valores de RQ. El resultado fue el mismo tanto para los valores de abundancia absoluta como relativa. Nuevamente, esta ausencia de interacción sugiere que la aplicación de glifosato en los microcosmos no influye sobre la sensibilidad a desecación-humedecimiento cuando se selecciona como indicador a las estimaciones de abundancia. Por lo tanto, los resultados provistos por ambas metodologías resultaron consistentes. La ausencia de interacción reviste importancia también considerando que la exposición aguda (en un corto período de tiempo) a ambos factores de perturbación podría tener efectos sinérgicos, es decir, mayores que los correspondientes efectos de los factores individuales sobre indicadores sensibles. La sinergia frente a disturbios combinados es un fenómeno que ya ha sido reportado en otros estudios (Heuer *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2013), aunque no existen estudios previos para la combinación de desecación-humedecimiento y glifosato. En base a estas consideraciones, la ausencia de interacción observada en este estudio constituye un resultado en sí mismo novedoso y sugiere que tal sinergia no se presentaría frente a ambos factores combinados y bajo las condiciones estudiadas. Sin embargo, el tema deberá abordarse en mayor profundidad en futuras investigaciones, sobre todo considerando que las propiedades de adsorción del glifosato luego de una o de varias aplicaciones, podrían modificarse dependiendo de la presencia/ausencia de uno o de varios ciclos de desecación-humedecimiento. De hecho, el equilibrio entre el glifosato adsorbido y el glifosato en solución es afectado por la cantidad relativa de agua presente en el suelo (Gjettermann *et al.*, 2011). Posiblemente, el rápido humedecimiento luego de la desecación no haya alterado sustancialmente los niveles de glifosato en la solución del suelo.

La ausencia de interacción significativa entre ambos factores sobre la abundancia de *Actinobacteria* es consistente con las características de este grupo bacteriano, particularmente tolerante a condiciones adversas como desecación-humedecimiento (LeBlanc *et al.*, 2008; Evans y Wallenstein, 2011). En otras palabras, la presencia/ausencia

CAPÍTULO 3

de una aplicación de glifosato no condiciona la tolerancia característica de este grupo al ciclo de desecación-humedecimiento.

La significancia estadística observada para el efecto principal desecación-humedecimiento sobre la abundancia de BOA en el sitio H indica que la comunidad de bacterias oxidantes del amoníaco de este suelo podría ser particularmente sensible al disturbio, incrementando su abundancia. En cambio, la abundancia de BOA como indicador sería menos sensible a la aplicación de glifosato, dado que no se observó un efecto principal significativo. Este último resultado es esperable en base a lo observado en el estudio presentado en el Capítulo 2, donde se reporta ausencia de modificaciones en la abundancia de BOA luego de tres aplicaciones del FC en sitios H y NH de Zavalla. Cabe destacar que el ciclo de desecación-humedecimiento (CD) condujo a un incremento en la abundancia del gen *amoA_{BOA}* respecto de microcosmos que no recibieron el tratamiento (SD). Si bien las BOA, al igual que otras bacterias gram negativas, tienden a ser afectadas por re-humedecimientos rápidos luego de desecación, se han observado casos en los que el número original de BOA puede recuperarse rápidamente (en 18 días) al producirse la rehidratación (Hastings *et al.*, 2000). Son escasos los trabajos referidos a efectos de estos ciclos en BOA (Hastings *et al.*, 2000; Gleeson *et al.*, 2008; Bustamante *et al.*, 2012) y, si bien se ha observado la recuperación de la abundancia de este grupo microbiano (Hastings *et al.*, 2000), no se encontraron reportes donde el número de BOA alcance valores mayores que en ausencia del disturbio. A nivel del proceso de nitrificación, Fierer y Schimel (2002) reportaron un notable incremento en la actividad de poblaciones nitrificantes autotróficas luego de varios ciclos de desecación-humedecimiento, un resultado consistente con el observado en este trabajo donde se observa un incremento en la abundancia de BOA. Si bien el objetivo principal de este capítulo de la Tesis no fue estudiar el efecto de desecación-humedecimiento sino su interacción con la aplicación de glifosato, el resultado mencionado deberá explorarse más profundamente en futuros estudios dado que constituye un resultado particularmente novedoso.

La ausencia de interacción entre glifosato y desecación-humedecimiento es importante de destacar para el gen *amoA_{BOA}* como indicador (en lo que respecta a sensibilidad), dado que las BOA son sensibles no sólo a pesticidas sino también a la disponibilidad de agua (Franzluebbers *et al.*, 1995; Hastings *et al.*, 2000; Gleeson *et al.*, 2010). Por lo tanto, esta observación indica que la sensibilidad esperable frente a ambos factores no implica necesariamente una interacción significativa entre ellos. En otras palabras, la respuesta a estreses combinados no puede predecirse analizando simplemente los efectos individuales esperados de cada factor.

CAPÍTULO 3

Las poblaciones de AOA fueron más abundantes que las de BOA para todos los tratamientos. Sin embargo, a diferencia de éstas, no fueron afectadas por la aplicación de glifosato ni por el ciclo de desecación-humedecimiento (Tabla 16). Los resultados son consistentes con los reportados por Gleeson *et al.* (2010), quienes indicaron que la abundancia del gen *amoA*_{BOA} presenta una mayor respuesta o “reacción” a la disponibilidad de agua en el suelo que el gen *amoA*_{AOA}. Asimismo, también apoyan los resultados de otros estudios que han indicado una mayor abundancia pero menor respuesta del gen *amoA*_{AOA} a tratamientos con compuestos químicos como fungicidas (mancozeb) (Feld *et al.*, 2015) y microcistinas (Corbel *et al.*, 2015). Recientemente, un estudio en microcosmos sometidos a tres tratamientos (fertilizante, glifosato + fertilizante, control) también arrojó el mismo resultado: sólo las BOA fueron sensibles al tratamiento y mostraron menor abundancia que las AOA (Zabaloy *et al.*, 2017).

Los efectos de la perturbación introducida mediante desecación-humedecimiento se detectaron al considerar tanto la abundancia del gen *amoA*_{BOA} como indicador (Tablas 16 y 17) como así también al considerar conjuntamente los datos de qPCR y de respiración (análisis multivariado) (Tabla 18, Figura 23). Se observó una separación a lo largo de la componente que explica el mayor porcentaje de la variancia total (Figura 23). Si bien no es una separación completa, el efecto de desecación-humedecimiento alcanza a ser significativo (Tabla 18). La combinación de valores de abundancia para los genes indicadores de los tres grupos específicos evaluados (*Actinobacteria*, BOA y AOA) permitiría diferenciar la presencia/ausencia de efectos de desecación-humedecimiento en el suelo H. Sin embargo, *Actinobacteria* parece explicar mayormente esta separación (Anexo III, Tabla 55). Es importante remarcar que si bien puede concluirse una cierta sensibilidad de las comunidades microbianas del sitio H a esta perturbación, no es posible concluir respecto de la influencia que pudo haber tenido la exposición crónica a glifosato (durante varios años) sobre la mayor o menor sensibilidad al ciclo de desecación-humedecimiento. Esto se debe a que existen otros factores además del herbicida que podrían haber actuado a campo en ese sitio en particular contribuyendo a dicha sensibilidad, como fue discutido en el Capítulo 1.

El análisis de la variancia multivariado (Tabla 18) indicó nuevamente una interacción no significativa entre los factores estudiados, al igual que el análisis univariado. De esta manera, a partir de las evidencias obtenidas (ausencia de interacción, Tablas 16, 17 y 18) es posible concluir que, bajo las condiciones del experimento realizado, no existe un fenómeno de condicionamiento en la respuesta de comunidades microbianas a un ciclo de desecación-humedecimiento en presencia/ausencia de una aplicación de glifosato. La ausencia de interacción frente a disturbios o estreses combinados, con glifosato como uno de ellos,

constituye un resultado novedoso dado que, de acuerdo con la revisión de la literatura, no se han publicado estudios que exploren específicamente esta interacción. Sin embargo, en simbiosis entre bacterias fijadoras de N_2 y raíces de soja GR, un sistema biológico distinto al aquí estudiado, se han obtenido evidencias que indican que la desecación podría condicionar la sensibilidad al tratamiento con glifosato. En este sentido, Zablotowicz y Reddy (2004) observaron que la actividad nitrogenasa de los nódulos radicales es inhibida de manera transiente en etapas tempranas del crecimiento luego de la aplicación de glifosato y que esa inhibición es mayor en condiciones de desecación.

El reducido número de bandas observadas en los perfiles de DGGE del gen *amoA*_{BOA} muestran una escasa riqueza genética de BOA en el suelo analizado. Este resultado está de acuerdo con los reportes previos de un estudio biogeográfico que reveló un bajo nivel de diversidad de secuencias en comunidades de BOA, donde la mayoría de las secuencias pertenece a linajes de *Nitrosospira* (Fierer *et al.*, 2009). Rousidou *et al.* (2013) también observaron un bajo número de fragmentos de restricción terminales en perfiles T-RFLP de amplicones del gen *amoA*_{BOA}, pertenecientes a poblaciones dominantes de *Nitrosospira* spp., en un suelo franco arenoso. Más recientemente, en un estudio en microcosmos de suelo franco arenoso de la región Pampeana semiárida, se detectó la misma característica para comunidades de BOA (Zabaloy *et al.*, 2017). Por otro lado, no se observó una separación obvia entre microcosmos con y sin desecación-humedecimiento que sugiera un efecto principal del ciclo de desecación-humedecimiento en la estructura de la comunidad de BOA. Es decir, si bien el análisis de BOA mediante qPCR indicó un incremento en la abundancia de este grupo microbiano al aplicar un ciclo de desecación-humedecimiento, la estructura de la comunidad (reflejada en los perfiles de DGGE) no muestra la misma sensibilidad al disturbio. La separación observada de dos de las réplicas del tratamiento CD/SG respecto de las tres réplicas del tratamiento CD/CG (Figura 22) podría indicar una interacción de los efectos de ambos factores en la estructura de BOA, ya que la misma separación no se observa entre los tratamientos SD/SG y SD/CG, situación que deberá confirmarse en nuevos análisis, por ejemplo, mediante análisis de diversidad β luego de amplificación y secuenciación masiva del gen *amoA*. La ausencia de interacción a nivel de abundancia de BOA (Tabla 16) podría verificarse mediante el análisis de parámetros de tipo funcional como ensayos de potencial de nitrificación, el cual refleja la producción inmediata de nitrato en una suspensión homogénea de suelo en exceso de sustrato (Ouyang *et al.*, 2016), o bien N-nitrato extractable, tal como han sido analizados en microcosmos por Zabaloy *et al.* (2017).

Finalmente es importante destacar la importancia de continuar estudiando la interacción entre la exposición a glifosato y a desecación-humedecimiento como agentes de perturbación de comunidades microbianas en suelos de la Región Pampeana. Particularmente, el estudio de aplicaciones repetidas en simultáneo con múltiples ciclos de desecación-humedecimiento podría revelar respuestas de las comunidades microbianas diferentes a las observadas en este estudio. La frecuencia con la que se presentan simultáneamente ambos factores en la región podría incrementarse en el largo plazo si se tiene en cuenta que cada vez son más recurrentes tanto las aplicaciones repetidas del herbicida y en dosis crecientes debido a la evolución de malezas resistentes (Cerdeira y Duke, 2006; Duke *et al.*, 2012), como también los fenómenos climáticos que conducen a ciclos de sequías-lluvias intensas en las campañas agrícolas. Los modelos climáticos a nivel planetario actuales predicen una intensificación del ciclo hidrológico que tendrá como consecuencia largos períodos de sequía y eventos de precipitaciones más intensas (Huntington, 2006). Por otro lado, debe tenerse en cuenta que si bien el suelo superficial está sometido comúnmente a fluctuaciones de humedad, los eventos de desecación-humedecimiento son especialmente importantes en ambientes áridos y semiáridos (Iovieno y Bååth, 2008). Un ejemplo de ello es la Región Pampeana semiárida (sudoeste de la Pcia. de Buenos Aires), donde el glifosato es ampliamente utilizado para el control de malezas en barbechos y cultivos de invierno (Vigna *et al.*, 2008) como así también para el secado de cultivos de cobertura (Pereira *et al.*, 2012).

7. Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos se confirma la hipótesis postulada originalmente a partir de los resultados del ensayo PICT: la tolerancia de las comunidades microbianas a desecación-humedecimiento es similar en ambos sitios (H y NH) dado que en ninguno de ellos se observa un efecto principal significativo de este factor sobre los cocientes respiratorios. En otras palabras, la similitud en las respuestas fisiológicas de los sitios H y NH frente al ciclo de desecación-humedecimiento es consistente con la ausencia de una respuesta PICT (Capítulo 1), apoyando dicho resultado.

Se concluye también que una única aplicación de glifosato en microcosmos no parece influir sobre la tolerancia a desecación-humedecimiento, dado que no se detectó interacción entre ambos factores al evaluar los RQ en ambos sitios. En el caso particular del sitio H, la ausencia de interacción también se observó con los indicadores moleculares independientes de cultivo (estimaciones de abundancia de bacterias totales, *Actinobacteria*, AOA y AOB),

aportando más evidencias sobre ello junto con las obtenidas previamente con el indicador fisiológico (RQ).

Las BOA son sensibles a un ciclo de desecación-humedecimiento en el suelo analizado (sitio H), observándose un incremento en la abundancia estimada a partir del número de copias del gen *amoA*_{BOA}. Sin embargo, el diseño y las evidencias del estudio no son suficientes para concluir que esta respuesta es consecuencia de la larga historia de exposición a glifosato de ese sitio en particular, pues otros factores que actuaron a campo podrían estar contribuyendo a dicha sensibilidad. De la misma manera, aun cuando la integración de todos los indicadores en el ordenamiento multivariado revela un efecto del ciclo de desecación-humedecimiento para el sitio H, no es posible atribuir la sensibilidad a este disturbio como una consecuencia de la exposición crónica previa a glifosato. En cambio, sí puede concluirse que una única aplicación de glifosato (exposición aguda), en microcosmos, no condiciona la tolerancia a un ciclo de desecación-humedecimiento (ausencia de interacción).

Estudios futuros deberán determinar si estos mismos resultados se mantienen frente a ciclos repetidos de desecación-humedecimiento o bien frente a otros agentes de disturbio o de estrés de las comunidades microbianas.

CAPÍTULO 4

DESECACIÓN DE CULTIVOS DE COBERTURA CON GLIFOSATO: ANÁLISIS DE IMPACTO SOBRE COMUNIDADES MICROBIANAS RIZOSFÉRICAS EN RELACIÓN A UN MÉTODO DE FINALIZACIÓN SIN HERBICIDA

1. Introducción

De acuerdo con la revisión de la literatura existente, la mayor parte de los estudios de impacto de glifosato en comunidades microbianas del suelo se han centrado principalmente en suelo no rizosférico (*bulk soil*) o bien en la rizosfera de cultivos resistentes a glifosato (*Glycine max* L. y *Zea mays* L., principalmente). No obstante, un número considerablemente menor de estudios han abordado la comparación de comunidades microbianas de la rizosfera de plantas sensibles, sometidas a manejos con y sin glifosato (Mijangos *et al.*, 2009; Druille *et al.*, 2015; Imparato *et al.*, 2016). Los cultivos de cobertura (CC) constituyen un claro ejemplo a nivel agronómico de cultivos sensibles tratados con este herbicida durante la etapa de finalización o secado. El intercalado de estos cultivos en la Región Pampeana ha ganado una creciente popularidad dentro de las prácticas agrícolas sustentables debido a múltiples razones: 1) aportan residuos vegetales ricos en carbono (C) ayudando a mantener el carbono de los suelos o atenuar su pérdida (Chavarría *et al.*, 2016) 2) promueven y mantienen la cobertura del suelo ayudando a prevenir la erosión, las pérdidas por lixiviación y a aumentar la infiltración y la captura de nutrientes (Lu *et al.*, 2000) 3) contribuyen al control de malezas (Teasdale, 1996) 4) permiten explorar, mediante sus raíces, nuevos volúmenes de suelo y generar la porosidad estructural faltante (Villamil *et al.*, 2006) y mejorar la estabilidad (Varela *et al.*, 2011). Asimismo, contribuyen a la provisión de servicios ecosistémicos, como la preservación de la calidad del agua, mediante la reducción de lixiviación de nitratos (Justes *et al.*, 1999). La diversidad catabólica y la funcionalidad de las comunidades microbianas del suelo también son estimuladas por la inclusión de CC. Un estudio reciente indicó una utilización incrementada de diferentes sustratos carbonados como así también en la actividad deshidrogenasa, indicando una mayor actividad microbiana que en los tratamientos sin CC (Chavarría *et al.*, 2016).

Los CC se establecen entre dos cultivos de cosecha, generalmente entre el comienzo del otoño y el de la primavera en reemplazo del barbecho. No son pastoreados, incorporados ni cosechados, quedando los residuos en superficie protegiendo al suelo de los procesos de erosión y liberando nutrientes como resultado de procesos de degradación de la biomasa aérea y radicular de los mismos (Carfagno *et al.*, 2012). Previo a la siembra del cultivo de

cosecha, es necesaria la desecación del CC, para lo cual se utiliza glifosato, debido al amplio espectro y a la naturaleza no selectiva de este herbicida (Legleiter *et al.*, 2012).

La finalización del CC utilizando herbicidas como glifosato constituye una alternativa a otros métodos de finalización completamente diferentes que no emplean agentes químicos y que se basan en la acción mecánica como el corte o el rolado. A pesar de que se han desarrollado y evaluado técnicas mecánicas (Kornecki *et al.*, 2013), la utilización de herbicidas sigue siendo un método ampliamente utilizado. Considerando la utilización creciente de los CC en la Región Pampeana, resulta fundamental y necesaria la comparación de métodos de finalización con y sin glifosato en lo que respecta a las comunidades microbianas presentes en la rizosfera, con el propósito de determinar qué parámetros estructurales y funcionales difieren en ambos casos. De este modo, sería posible encontrar indicadores asociados a esta práctica agronómica en particular contribuyendo a la evaluación de su sustentabilidad ambiental. Asimismo, debe tenerse en cuenta que los cultivos de cosecha siguientes al CC podrían verse influenciados diferencialmente por las comunidades microbianas que se han establecido en las raíces remanesentes luego de aplicarse uno u otro método de finalización. De hecho, si bien esto último no ha sido investigado a nivel de comunidades microbianas de la rizosfera, se ha determinado que los residuos de glifosato presentes en tejidos radiculares de malezas blanco pueden afectar el crecimiento de un cultivo sembrado posteriormente en el mismo suelo. Esto se observó particularmente para girasol (*Helianthus annuus* L.) sembrado en un suelo en el que la maleza (*Lolium perenne* L.) fue eliminada previamente con glifosato respecto de un suelo donde la maleza fue removida por corte mecánico (Teschmariam *et al.*, 2009). Asimismo, los hallazgos iniciales de la exudación de glifosato en plantas sensibles (Coupland y Caseley, 1975; Rodrigues *et al.*, 1982) y luego en plantas resistentes (Kremer *et al.*, 2005) junto con los resultados reportados por Laitinen *et al.* (2007) indican que la rápida translocación y la exudación del glifosato por parte de la planta pueden aportar una cantidad significativa de este compuesto en el suelo. El estudio de Laitinen *et al.* (2007) recomendó la inclusión de procesos de translocación y exudación de glifosato en evaluaciones de impacto del herbicida, dado que la exudación permite el acceso del herbicida hacia zonas más profundas donde penetra la raíz, bajo condiciones donde muchas veces la lixiviación desde la superficie del suelo no podría ocurrir. Al mismo tiempo, se sugirió considerar los efectos de residuos de glifosato en el suelo sobre cultivos sucesores no tolerantes al herbicida. La capacidad del glifosato de modificar tanto la calidad (composición) como la cantidad de los exudados radiculares (Kremer *et al.*, 2005) junto con la exudación directa de glifosato a la rizosfera podrían influir no sólo en la estructura de las

comunidades microbianas de la rizosfera sino también en los elementos genéticos móviles (EGMs) allí presentes (“mobiloma”), los cuales desempeñan un rol clave en la adaptación y funcionamiento de las comunidades. La rizosfera, en particular, es un *hot spot* de transferencia horizontal de genes (THG) (Heuer y Smalla, 2012) y por lo tanto estas modificaciones en los exudados radicales podrían influenciar la THG.

De esta manera, la comparación directa de métodos de finalización de CC constituye un aspecto de gran relevancia en el entendimiento de aquellas diferencias microbiológicas que podrían influir en cultivos sucesores. En este capítulo se presentan resultados correspondientes a la comparación de los efectos de un método de finalización mecánico (corte de la planta en la superficie) contra el secado químico con glifosato sobre comunidades microbianas de la rizosfera, en *Avena sativa* L. como cultivo de cobertura.

De acuerdo con la revisión de la literatura, no existen reportes previos de evaluación de comunidades microbianas rizosféricas de plantas sensibles a glifosato tratadas con el herbicida considerando simultáneamente múltiples aspectos de la comunidad, entre ellos, la diversidad catabólica, la diversidad α y β , la abundancia de grupos específicos y ecológicamente relevantes de microorganismos (BOA y AOA) como así también la detección de EGMs. Mijangos *et al.* (2009) evaluaron el impacto del tratamiento con glifosato en un cultivo sensible (\times *Triticosecale* Wittm. ex A.Camus) en relación a un método sin herbicida (corte de la planta). Sin embargo, no se analizó el metagenoma y el análisis fisiológico se realizó mediante el sistema Biolog, que presenta varias limitaciones, tal como se indicó en la Introducción General de la Tesis. Imperato *et al.* (2016) evaluaron también estos tratamientos en la rizosfera de cebada (*Hordeum vulgare* cv. Asano) pero no se analizaron ninguno de los aspectos previamente mencionados. En este capítulo se estudiarán las comunidades microbianas rizosféricas de *A. sativa* desde una aproximación funcional (BDOBS-CLPP), una aproximación metagenómica y también mediante el análisis de grupos específicos (AOA/BOA) y de EGMs (plásmidos BHR e integrones).

2. Objetivo específico

Estudiar el impacto de la desecación de un cultivo de cobertura (*Avena sativa* L.) con glifosato sobre comunidades microbianas de la rizosfera en relación a un método de finalización sin herbicida.

3. Hipótesis

Los métodos de finalización aplicados al cultivo de cobertura influyen diferencialmente sobre las comunidades microbianas de la rizosfera. En relación a ello, se predice que las diferencias se observarán tanto a nivel fisiológico como de estructura de la comunidad y

también en la abundancia de EGMs. Al estimular la exudación de aminoácidos y carbohidratos (Kremer *et al.*, 2005) se espera que el glifosato incremente la diversidad catabólica de las comunidades microbianas. Asimismo, a partir de la reconocida exudación de glifosato, se espera que los exudados obtenidos de plantas tratadas con el herbicida incrementen la respuesta respiratoria en relación a los obtenidos de plantas sometidas a corte, debido al estrés metabólico desencadenado por el glifosato sobre microorganismos sensibles (Zabaloy *et al.*, 2012). Por su parte, teniendo en cuenta que los rizodepósitos tienen un rol determinante en la estructura de las comunidades microbianas rizosféricas (Haichar *et al.*, 2008), que los exudados contribuyen en gran medida a los rizodepósitos (Berg y Smalla, 2009) y que la composición y cantidad de los exudados es influenciada por la fisiología de la planta y el factor tiempo (Philipott *et al.*, 2013), la diversidad β también reflejaría los efectos diferenciales de los métodos de finalización y de los diferentes momentos post-tratamiento. Se espera que las comunidades se ordenen separadamente en función del método de finalización y que esa separación difiera en distintos momentos post-tratamiento. La abundancia de grupos específicos de microorganismos será sensible también a la presencia de glifosato en los exudados, principalmente aquellos de reconocida sensibilidad a pesticidas (MOA) y aquellos con reconocida capacidad de degradación de glifosato o de otros fosfonatos. Mientras que los primeros se verían afectados en la rizosfera de plantas tratadas con glifosato (menor abundancia) los segundos se verían favorecidos (mayor abundancia). Finalmente, la exudación incrementada de aminoácidos y carbohidratos y la presión de selección introducida por el IA y los aditivos podrían estimular la THG e incrementar la abundancia de EGMs (plásmidos IncP-1 e integrones) (van Elsas *et al.*, 2003).

4. Materiales y métodos

4.1 Diseño del ensayo

El experimento se llevó a cabo utilizando un diseño completamente aleatorizado con dos factores de estudio: *método de finalización* (M) y *fecha de muestreo* (S), cada uno de ellos a dos niveles, tal como se describirá posteriormente. En Septiembre de 2015, se obtuvo una muestra compuesta de 20 piques de suelo (0-15 cm) en un espacio de 25 x 25 m², en el mismo sitio con historia de aplicación de glifosato del Campo Experimental Villarino mencionado en la Sección 2.1.1 del Capítulo 1. El suelo se tamizó (<6 mm) y se utilizó para la preparación de macetas en las que se sembró *Avena sativa* L. var. Cristal INTA (15 semillas por maceta). Se utilizaron macetas de 3 litros de capacidad con 1,8 kg de una mezcla de suelo:perlita (80:20). El ensayo se llevó a cabo en invernáculo bajo las siguientes

condiciones: temperatura 16/28 °C (promedio mínima/máxima), 13/11 horas de luz/oscuridad en promedio de acuerdo a la época de crecimiento (4 de Septiembre a 10 de Noviembre) (luz natural, sin luz adicional) y con buena humedad mediante riego por capilaridad tres veces por semana (Mijangos *et al.*, 2009; Arango *et al.*, 2014). El tiempo de crecimiento de las plantas en invernáculo fue de 67 días, de manera de aplicar los métodos de finalización en una etapa vegetativa temprana de la planta (etapa de encañado), previa a la formación de inflorescencias. Este período de tiempo es menor al que correspondería para una fecha de secado temprano (aproximadamente 5 meses) (Cassigneul *et al.*, 2016). No obstante, se priorizó la selección de un tiempo similar al empleado por Mijangos *et al.* (2009) en triticale, de modo de poder contrastar los resultados con este estudio de referencia sobre el impacto de glifosato en rizosfera de plantas sensibles.

A los 67 días desde la fecha de siembra, se aplicaron dos métodos de finalización:

- 1) Corte mecánico de la planta (C) con pinza a 1 cm desde la superficie del suelo (Snapp y Borden, 2005).
- 2) Secado de la planta con aplicación de glifosato (G) (formulado comercial Eskoba Full, Red Surcos, 662 g IA l⁻¹, sal monopotásica) a una dosis equivalente a 4 litros ha⁻¹, dosis típicamente utilizada para el secado de CC en la región Pampeana (Pereira *et al.*, 2012; Sáenz y Colazo, 2012), teniendo en cuenta el área cubierta por la maceta (0,017 m²) para la equivalencia.

A su vez, se consideraron cuatro fechas de muestreo de suelo rizosférico luego de la aplicación del método de finalización correspondiente: 4 días (4D), 10 días (10D), 17 días (17D) y 26 días (26D). El muestreo en cada fecha fue destructivo, se utilizaron cuatro réplicas por cada uno de los ocho tratamientos (32 macetas), donde cada tratamiento estuvo definido por la combinación de niveles de los dos factores (M×S) (Tabla 19).

En cada fecha de muestreo se obtuvo suelo rizosférico de las correspondientes macetas definiendo al suelo desprendido mediante agitación moderada como suelo no rizosférico (*bulk soil*), mientras que el suelo remanente que fue removido de la raíz mediante desprendimiento manual con un peine estéril (columna de suelo de hasta 5 mm de espesor, aproximadamente, sujeta a las raíces) fue considerado como suelo rizosférico, de acuerdo a lo sugerido por Yanai *et al.* (2003). Sólo se tuvo en cuenta el suelo estrechamente adherido a las raíces tras la agitación inicial. Los bloques de suelo de varios centímetros de espesor que permanecieron unidos a la raíz luego de la agitación inicial fueron desprendidos y no se incorporaron a las muestras. En cada maceta se extrajeron cinco plantas y se conformó una mezcla compuesta con cantidades iguales de suelo rizosférico de cada una de las cinco plantas (la mezcla fue tratada posteriormente como una única muestra de esa unidad

CAPÍTULO 4

experimental). Esta mezcla de suelo rizosférico de las cinco plantas se realizó no sólo para minimizar el efecto de la variación genética entre plantas, tal como se procedió en un estudio similar (Arango *et al.*, 2014), sino también para disponer de una cantidad suficiente de suelo rizosférico para llevar a cabo todos los análisis que se mencionan a continuación. Las muestras de suelo rizosférico fueron tamizadas (<2 mm) y almacenadas a -80°C para los análisis moleculares. Asimismo, un parte de la muestra de cada maceta fue utilizada inmediatamente el día del muestreo para la obtención de perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas (CLPP) (Sección 4.3.1).

Tabla 19. Tratamientos y designación de cada una de las muestras analizadas.

Muestra	Método de finalización (M)	Fecha de muestreo (S)	Tratamiento (M×S)	Número identificador (Sección 5.1.1, Sección 5.2.3)
C1.4D	Corte (C)	4 días (4D)	C.4D	1
C2.4D	Corte (C)	4 días (4D)	C.4D	2
C3.4D	Corte (C)	4 días(4D)	C.4D	3
C4.4D	Corte (C)	4 días (4D)	C.4D	4
G1.4D	Glifosato (G)	4 días (4D)	G.4D	5
G2.4D	Glifosato (G)	4 días (4D)	G.4D	6
G3.4D	Glifosato (G)	4 días (4D)	G.4D	7
G4.4D	Glifosato (G)	4 días (4D)	G.4D	8
C1.10D	Corte (C)	10 días (10D)	C.10D	9
C2.10D	Corte (C)	10 días (10D)	C.10D	10
C3.10D	Corte (C)	10 días (10D)	C.10D	11
C4.10D	Corte (C)	10 días (10D)	C.10D	12
G1.10D	Glifosato (G)	10 días (10D)	G.10D	13
G2.10D	Glifosato (G)	10 días (10D)	G.10D	14
G3.10D	Glifosato (G)	10 días (10D)	G.10D	15
G4.10D	Glifosato (G)	10 días (10D)	G.10D	16
C1.17D	Corte (C)	17 días (17D)	C.17D	17
C2.17D	Corte (C)	17 días (17D)	C.17D	18
C3.17D	Corte (C)	17 días (17D)	C.17D	19
C4.17D	Corte (C)	17 días (17D)	C.17D	20
G1.17D	Glifosato (G)	17 días (17D)	G.17D	21
G2.17D	Glifosato (G)	17 días (17D)	G.17D	22
G3.17D	Glifosato (G)	17 días (17D)	G.17D	23
G4.17D	Glifosato (G)	17 días (17D)	G.17D	24
C1.26D	Corte (C)	26 días (26D)	C.26D	25
C2.26D	Corte (C)	26 días (26D)	C.26D	26
C3.26D	Corte (C)	26 días (26D)	C.26D	27
C4.26D	Corte (C)	26 días (26D)	C.26D	28
G1.26D	Glifosato (G)	26 días (26D)	G.26D	29
G2.26D	Glifosato (G)	26 días (26D)	G.26D	30
G3.26D	Glifosato (G)	26 días (26D)	G.26D	31
G4.26D	Glifosato (G)	26 días (26D)	G.26D	32

4.2 Obtención de exudados radicales

Las raíces que se utilizaron para la obtención de los exudados en cada fecha de muestreo fueron las mismas a las que previamente se les extrajo todo el suelo rizosférico adherido (Sección 4.1). El exudado de plantas cortadas (Ex_C) se obtuvo juntando el sistema de raíces de las 5 plantas muestreadas en cada una de las réplicas sin glifosato (20 plantas en total: cuatro réplicas \times cinco plantas). De igual forma se procedió para obtener el exudado proveniente de plantas tratadas con glifosato (Ex_G). Para la preparación de los exudados radicales se siguió el procedimiento descrito por Egle *et al.* (2003). En primer lugar, todo el sistema de raíces se lavó completa y cuidadosamente bajo el flujo de agua de la canilla de manera de remover todo el cuarzo y la arena remanente. Luego el sistema de raíces se sumergió completamente en un Erlenmeyer conteniendo 200 ml de una solución 0,05 mM de $CaCl_2$ (pH 5,5) durante 1 h de manera tal de desprender posibles células dañadas durante la remoción del suelo rizosférico y el posterior lavado, como así también para permitir la adaptación de las raíces antes de recoger los exudados. La solución fue descartada y se colocaron las raíces nuevamente en 200 ml de la solución colectora (0,05 mM de $CaCl_2$, pH 5,5). Se dejó exudar las raíces durante 4 horas en el invernáculo en las mismas condiciones donde fueron crecidas las plantas, durante el período diurno. El exudado obtenido en cada caso fue esterilizado por filtración (Sartorius Minisart 0,2 μm) y utilizado inmediatamente para preparar las placas BDOBS (100 μl).

4.3 Análisis fisiológico de comunidades microbianas

4.3.1 Perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas (CLPP)

Para la obtención de perfiles fisiológicos se cuantificó el oxígeno consumido utilizando el sistema de microplacas sensoras fluorescentes BDOBS (BD Oxygen Biosensor System®, Wodnicka *et al.*, 2000), empleado en los capítulos anteriores y descrito en la Introducción General de la Tesis. La microplaca fue inoculada con 200 μl de la suspensión de suelo rizosférico (relación suelo:agua 1:7,5) y los correspondientes sustratos (100 μl). Se seleccionaron sustratos de diferente estructura química (aminoácidos, carbohidratos, ácidos orgánicos y un surfactante) y que han mostrado diferencias significativas entre tratamientos con y sin glifosato utilizando suelo rizosférico de otros cultivos sensibles (Mijangos *et al.*, 2009), como así también en base a los estudios en suelo no rizosférico mencionados en los capítulos anteriores (Allegrini *et al.*, 2017) y en otros estudios con glifosato (Busse *et al.*, 2001; Zabalo *et al.*, 2012). Los sustratos evaluados fueron: L-fenilalanina, L-asparagina, sarcosina, D-celobiosa, D-xilosa, piruvato de sodio, fumarato de sodio y ácido *p*-cumárico (Sigma) como así también el surfactante Tween 20 (Promega). Cabe destacar que, junto

con el criterio de selección mencionado previamente, los aminoácidos L-fenilalanina y L-asparagina, los carbohidratos D-celobiosa y D-xilosa y el surfactante Tween se encuentran dentro del set de 31 sustratos propuestos por Insam (1997) para una adecuada caracterización de muestras ambientales. Por su parte, el piruvato y el ácido *p*-cumárico se encuentran relacionados con el metil-piruvato y ácido 4-hidroxibenzoico, respectivamente, también sugeridos por Insam (1997). La concentración final de los sustratos fue de 50 mg l⁻¹ para todos, excepto Tween 20 (3 ppm). Se determinó también la respiración basal adicionando el mismo volumen (100 µl) de agua destilada estéril en lugar de sustrato. En las mismas placas se evaluó la respiración microbiana en presencia de exudados radicales obtenidos de plantas tratadas con glifosato y de plantas sometidas al método de corte, obtenidos mediante el procedimiento descrito en la sección anterior.

Las medidas cinéticas de fluorescencia se registraron desde el fondo de la placa (*bottom-reading*) de la misma manera que se indicó en la Sección 4.2.1 del Capítulo 1. Los valores de NRFU fueron graficados vs tiempo (hs) para obtener las curvas de respiración. El área integrada bajo la curva de respiración (AUC) fue calculada entre 1 y 6 hs utilizando el software SigmaPlot 10.0 (Systat Software, Inc., San José, CA, USA). Este período inicial de tiempo fue seleccionado para incluir sólo la respuesta respiratoria de poblaciones microbianas que no se encuentren en crecimiento activo, de acuerdo con la definición de respiración inducida por el sustrato (SIR) (Horwath y Paul, 1994; Nannipieri *et al.*, 2003). En el caso particular del ácido *p*-cumárico se calculó además el RQ (RQ_{Ácido *p*-cumárico}), de la misma manera que en los capítulos anteriores.

4.3.2 Índices de diversidad funcional

La diversidad catabólica se estudió mediante el cálculo del índice de Shannon-Weaver (H'), tal como ha sido reportado también por Mijangos *et al.* (2009):

$$H' = -\sum p_i \log_2 p_i \quad (i=1\dots s, s=\text{número de sustratos utilizados})$$

Donde p_i = respuesta respiratoria (AUC) con el sustrato i entre 1-6 hs (r_i), en relación a la respuesta total considerando todos los sustratos ($\sum r_i$), es decir, $p_i = r_i / \sum r_i$.

Por su parte, la equitatividad de utilización de sustratos carbonados se calculó según Degens *et al.* (2001):

$$E = 1 / \sum p_i^2, \text{ donde } p_i = r_i / \sum r_i$$

Como se indicó en el Capítulo 3, el parámetro E puede ser utilizado como un indicador integrador de susceptibilidad de las comunidades microbianas a estreses o disturbios. A bajas intensidades de estrés, el parámetro E se incrementa tanto en suelos prístinos como

agrícolas. En cambio, en estos últimos, una alta intensidad de estrés conduce a una disminución más pronunciada que en suelos prístinos (Degens *et al.*, 2001).

4.3.3 *Análisis estadístico*

El análisis estadístico del grupo de datos multivariados se llevó a cabo mediante un análisis de componentes principales (ACP) utilizando el software estadístico R v.3.2.3 (R Development Core Team, 2016) y los paquetes FactoMineR (Husson y Mazet, 2007) y VEGAN (Oksanen, 2015). Se realizó un análisis basado en la matriz de variancias-covarianzas (datos no estandarizados) dado que los datos utilizados fueron todos del mismo tipo, es decir, con las mismas unidades de medición (NRFU**h*). Asimismo, con el ACP basado en la matriz de variancias-covarianzas se intentó preservar y representar las posiciones relativas de los objetos y la magnitud de la variación entre las variables en el espacio de dimensiones reducidas. Las distancias entre observaciones en este análisis constituyen una aproximación de las distancias Euclideas en el espacio multivariado (Ramette, 2007). Se utilizó un análisis multivariado de la variancia no paramétrico permutacional (NPMANOVA o ADONIS; Anderson, 2001) usando matrices de distancia (distancias Euclideas) y 1000 permutaciones para estudiar la existencia de efectos estadísticamente significativos ($\alpha=0,05$) del método de finalización, de la fecha de muestreo como así también para evaluar la interacción entre ambos factores (Ramette, 2007). En el caso particular de la interacción, un *P-value* entre 0,05 y 0,2 (es decir, cercano al nivel de significación), fue considerado como evidencia de interacción, realizándose comparaciones de niveles dentro de un mismo factor (Littell *et al.*, 2002). Para comparaciones de a pares entre los métodos de finalización dentro de cada fecha de muestreo se utilizó el test ANOSIM. Valores del estadístico R cercanos o mayores a 0,75 en el test ANOSIM se consideraron como grupos muy bien separados, mayores a 0,5 como separados, pero solapantes mientras que aquellos inferiores a 0,3 se consideraron como no separados (Ramette, 2007). La homogeneidad de variancias multivariada entre los ocho tratamientos (definidos por la combinación de niveles de los dos factores, Tabla 19) se verificó mediante el procedimiento *betadisper* empleando un test de permutación ($\alpha=0,05$) para evaluar la significancia del modelo (999 permutaciones). Para analizar la correlación entre las variables originales se obtuvo la matriz de correlación a partir de los datos estandarizados según la media y el desvío estándar de las variables.

Por su parte, las comparaciones de las medias de AUC de cada sustrato entre ambos métodos de finalización (dentro de cada fecha de muestreo) se realizaron mediante un test-t para muestras independientes a un nivel de significación del 5% y utilizando la corrección

para varianzas desiguales. La normalidad de los datos se verificó mediante el test de Shapiro-Wilks modificado ($\alpha=0,05$).

En el caso particular de respuestas a los exudados, la comparación se efectuó dentro de cada fecha en base a la consideración de que los exudados cargados en la placa BDOBS fueron los obtenidos para cada fecha en particular (no se utilizó un mismo exudado para todas las fechas de muestreo). Por este mismo motivo, los datos relacionados con los exudados se analizaron separadamente y no fueron considerados como un sustrato más en el análisis multivariado de los perfiles. Se utilizó un test-t para muestras independientes a un nivel de significación del 5% y utilizando la corrección para varianzas desiguales. La normalidad de los datos se verificó mediante el test de Shapiro-Wilks modificado ($\alpha=0,05$). Se utilizó el test de Wilcoxon para muestras independientes donde no se observó normalidad.

Para el análisis estadístico de los parámetros de diversidad funcional (H' y E), como así también para el $RQ_{\text{Ácido } p\text{-cumárico}}$ se utilizó un ANOVA de dos factores a un nivel de significación del 5%. Nuevamente, tal como se mencionó anteriormente, un $P\text{-value}$ entre 0,05 y 0,2 fue considerado como evidencia de interacción, realizándose comparaciones de niveles dentro de un mismo factor. Para comparaciones múltiples se utilizó el test de Tukey HSD ($\alpha=0,05$). Los supuestos de normalidad y de homogeneidad de variancias fueron verificados mediante el test de Shapiro-Wilks modificado y el test de Levene, respectivamente ($\alpha=0,05$). En el caso del $RQ_{\text{Ácido } p\text{-cumárico}}$ se utilizó una transformación (\log_{10}) de los datos para cumplir con el supuesto de homocedasticidad. En todos los casos se utilizó el software estadístico R v3.3.2 (R Development Core Team, 2016).

4.4 *Análisis molecular de las comunidades microbianas*

4.4.1 *Extracción de ADN de la comunidad y cuantificación*

Para la extracción de ADN de la comunidad microbiana se utilizó el kit comercial PowerSoil® DNA Isolation kit (MoBio Inc., Carlsbad, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante a partir de 250 mg de suelo. El ADN obtenido fue cuantificado usando el kit comercial QuantiFluor® ds DNA System (Promega) en un fluorómetro Quantus (Promega). Se separaron tres alícuotas: una de ellas se destinó a la pirosecuenciación, otra se utilizó para qPCR y otra se utilizó tanto para el análisis mediante PCR-DGGE como para el análisis de EGMs, siendo almacenadas a -20°C hasta su utilización.

4.4.2 *Análisis del metagenoma*

El análisis metagenómico descripto a continuación se llevó a cabo a partir de tres de las cuatro réplicas (Tabla 19) de ambos métodos de finalización obtenidas al inicio (4 días:

C1.4D, C2.4D, C3.4D; G1.4D, G2.4D, G3.4D) y al final del ensayo (26 días: C1.26D, C2.26D, C3.26D; G1.26D, G3.26D, G4.26D).

4.4.2.1 *Barcoded amplicon-sequencing*

El proceso de pirosecuenciación de amplicones del gen codificante para el ARNr 16S (*barcoded amplicon sequencing*), se llevó a cabo utilizando un secuenciador Roche 454 FLX Titanium mediante el procedimiento bTEFAP[®] (*bacterial 16S-based tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing*; Dowd *et al.*, 2008), con un largo de lecturas de 400 pb y una profundidad de 3000 lecturas nominales por muestra. El servicio de secuenciación contratado fue Molecular Research MR DNA (www.mrdnalab.com, MR DNA, Shallowater, Texas, USA). Los servicios proporcionados por MR DNA incluyeron la secuenciación, la obtención inicial de los amplicones a partir de ADN enviado y el procesamiento bioinformático posterior de las secuencias (*pipelines* de análisis: *denoising*, *chimera detection*, *OTU clustering*, clasificación taxonómica). Para la obtención de los amplicones se empleó una PCR en un único paso con 30 ciclos utilizando HotStarTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen, Valencia, CA) y las siguientes condiciones: 94°C por 3 min seguido de 28 ciclos de 94°C por 30 s, 53°C por 40 s y 72°C por 1 minuto; la elongación final fue de 5 min a 72°C. Los cebadores empleados en la PCR fueron 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') y 806R (5'-GGACTACVSGGGTATCTAAT-3'), dirigidos a la región V4 del gen codificante para el ARNr 16S. El par de cebadores utilizado amplifica una región del gen del ARNr 16S (V4) que proporciona información filogenética precisa y constituye un set de cebadores universales efectivos para análisis de comunidades bacterianas (Liu *et al.*, 2007). Estos cebadores fueron seleccionados debido a que presentan una buena cobertura sin sesgos significativos hacia fila específicos (*primer bias*), evitando que sean excluidos ciertos grupos como *Verrucomicrobia*, un filo ubicuo en comunidades microbianas del suelo y que puede encontrarse altamente representado pero que ha sido subestimado debido a sesgos en las amplificaciones del gen del ARNr 16S (Bergmann *et al.*, 2011).

Luego de la reacción de PCR, los productos amplificados de las diferentes muestras fueron mezclados en concentraciones equivalentes y purificados utilizando Agencourt Ampure beads (Agencourt Bioscience Corporation, MA, USA). Las bibliotecas preparadas a partir de las muestras fueron secuenciadas utilizando un secuenciador Roche 454 FLX Titanium Instruments y los reactivos correspondientes según las especificaciones del fabricante.

4.4.2.2 *Procesamiento de secuencias*

Los datos de secuencia (*pyrotags*) derivados de la pirosecuenciación fueron analizados por el servicio de secuenciación utilizando un *pipeline* de procesamiento específico perteneciente a la compañía MR DNA (www.mrdnalab.com, MR DNA, Shallowater, Texas, USA) en el cual se le eliminaron *barcodes* y cebadores, primeramente, y luego secuencias cortas (<200 pb), secuencias con asignación ambigua de bases y aquellas con extensiones de homopolímeros mayores a 6 pb. Mediante este *pipeline*, luego de la eliminación del ruido (*denosing*), se removieron singletons y quimeras (UCHIME) y se establecieron las unidades operativas taxonómicas (OTUs) con agrupamientos definidos a un 3% de divergencia (97% similitud) (UCLUST) (Dowd y Callaway, 2008; Dowd y Sun, 2008; Edgar, 2010; Swanson y Dowd, 2011). Finalmente, los OTUs fueron clasificados taxonómicamente utilizando el algoritmo de alineamientos locales BLASTn contra una base de datos curada del ARNr 16S también perteneciente al servicio de secuenciación. Esta base de datos es una base derivada tanto de GreenGenes (DeSantis *et al.*, 2006; <http://greengenes.secondgenome.com>), como de RDP II (<http://rdp.cme.msu.edu>) y de NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Las secuencias con una identidad a secuencias conocidas o muy bien caracterizadas del ARNr 16S mayor al 97% fueron asignadas taxonómicamente a nivel de especie, entre 95% y 97% a nivel de género, entre 90% y 95% a nivel de familia, entre 80% y 90% a nivel de orden, entre 80 y 85% a nivel de clase y entre 77 y 80% a nivel de filo (Handl *et al.*, 2013).

El *pipeline* de procesamiento de secuencias mencionado anteriormente, aplicado por el servicio de secuenciación, ha sido utilizado en diferentes estudios para el análisis de comunidades bacterianas (Mukherjee *et al.*, 2014; Ainsworth *et al.*, 2015; Hess *et al.*, 2015).

4.4.2.3 *Índices de diversidad α*

La diversidad α se estudió no sólo mediante los índices de heterogeneidad de Shannon-Weaver (H') y el recíproco del índice de Simpson ($1/\lambda$), sino también mediante determinación de la riqueza [número de OTUs observados (S') e índice de Chao-1] y de la equitatividad de cada muestra. De acuerdo con Kennedy y Smith (1995), es necesario considerar no sólo un índice de diversidad sino sus componentes separadamente (riqueza y equitatividad). Dos comunidades podrían tener el mismo valor de diversidad pero uno podría ser el resultado de una alta riqueza y baja equitatividad y el otro lo contrario. Para el cálculo de las métricas de diversidad α se utilizó el paquete VEGAN del software estadístico R (Oksanen, 2017). En este mismo paquete se obtuvieron las curvas de rarefacción y los

CAPÍTULO 4

datos fueron rarefaccionados según la muestra con el menor número de secuencias (1766 secuencias), previo al cálculo de las métricas de diversidad.

El índice de Chao-1 o S_{est} (Chao, 1984) es un índice comúnmente utilizado en estudios metagenómicos (ej.: Newman *et al.*, 2016a) para estimar la riqueza total de una comunidad (S), basado en los OTUs más raros de la misma:

$S_{est} = S' + [(f_1)^2 / (2 f_2)]$, donde f_1 corresponde al número de OTUs singletons (sólo una secuencia) y f_2 al de dobletones (sólo dos secuencias).

Los índices de diversidad serán designados en este capítulo como índices de *heterogeneidad*, de acuerdo a lo sugerido por Peet (1974), aunque otros autores los han designado de diferente manera (ej.: dominancia). El índice de Shannon-Weaver se basa en la incertidumbre de poder predecir con exactitud a cuál de las especies de una muestra pertenece un determinado individuo seleccionado al azar. Es el más utilizado y forma parte de los índices de heterogeneidad de tipo I, los cuales son sensibles a cambios en las especies más raras (Peet, 1974). En este caso, de acuerdo al paquete estadístico utilizado (VEGAN), el índice de Shannon-Weaver se calculó utilizando el logaritmo natural (ln), designándose como H' (Oksanen, 2017):

$$H' = -\sum p_i \ln p_i \quad (i=1 \dots S', S'=\text{número de OTUs en la muestra})$$

Donde p_i =abundancia relativa del i-ésimo OTU.

El índice H' puede variar entre el valor mínimo $H'=0$ (cuando la muestra contenga sólo una especie) y el valor máximo (H'_{max}) cuando todas las especies (S') se encuentren igualmente representadas ($H'_{max}=\ln S'$).

El índice de Simpson (λ), en cambio, se relaciona con la probabilidad de que dos individuos seleccionados al azar dentro de una muestra pertenezcan a la misma especie. El recíproco de este índice ($1/\lambda$), también conocido como Hill-2, es sensible a las especies dominantes o mejor representadas (índice de tipo II) (Peet, 1974) y puede variar entre 1 y el número de OTUs (S'). El índice de Simpson se calcula de la siguiente manera:

$$\lambda = \sum [n_i (n_i - 1)] / [N(N-1)] \quad \text{donde } n_i=\text{abundancia del i-ésimo OTU y } N=\text{tamaño de la muestra}$$

Dentro de los índices de equitatividad, uno de los evaluados fue el índice de equitatividad de Shannon (E_H), definido como la relación entre H' y H'_{max} , $E_H = H' / H'_{max}$. Este índice es uno de los más utilizados y puede variar entre 0 y 1. Compara la diversidad observada con la diversidad máxima esperada si todas las especies (en este caso OTUs) fueran igualmente abundantes (Peet, 1974). Un segundo índice analizado fue el índice de Hill o Hill-ratio ($R_{1/2}$), definido como la relación entre los números de Hill-1 y 2 (Hill= Hill-1 / Hill-2) (Peet, 1974; Kennedy y Smith, 1995). El número de Hill-2 corresponde al recíproco del índice de

Simpson, tal como se indicó anteriormente. Por su parte, el índice de Shannon en su forma antilogarítmica ($e^{H'}$), también denominado número de Hill-1 o formulación de Shannon, corresponde al número de especies que, estando equitativamente distribuidas en sus abundancias, producen el mismo valor de H' que el de la muestra bajo estudio. Las variaciones en los valores del cociente $R_{1/2}$ reflejan variaciones en la contribución, tanto de las especies raras como de las más comunes, al índice de diversidad. Por esta razón, ha sido recomendado por Peet (1974) por sobre otros índices. A medida que la heterogeneidad se reduce, el valor de los índices de diversidad (Hill-1 y Hill-2) disminuye y el cociente se acerca a 1. Un valor bajo de $R_{1/2}$ cercano a 1 puede estar indicando que la heterogeneidad es baja o que la dominancia se encuentra distribuida entre un pequeño número especies más comunes de la comunidades (Peet, 1974).

4.4.2.4 Análisis estadístico

4.4.2.4.1 Diversidad α

Los datos de diversidad α (riqueza, equitatividad e índices de heterogeneidad) fueron analizados mediante un ANOVA de dos factores ($\alpha=0,05$) en el software estadístico R v.3.2.3 (R Development Core Team, 2016). Para la interacción, se realizó la misma consideración que la mencionada anteriormente respecto del *P-value* (Sección 4.3.3). Los supuestos de normalidad de residuos y de homogeneidad de variancias se verificaron mediante el test de Shapiro-Wilks modificado y el test de Levene, respectivamente ($\alpha=0,05$). Asimismo, se realizaron comprobaciones gráficas (QQ-plot para normalidad y gráfico de residuos vs predichos para homocedasticidad). El análisis estadístico fue posible dado que se trabajó con índices de diversidad α calculados en base a datos rarefaccionados según la muestra con el menor número de secuencias. Como se indicó en la Introducción General, para que los valores de las métricas de diversidad alfa sean comparables entre muestras, es necesario que el esfuerzo de muestreo (en este caso, la cantidad de secuencias) haya sido similar.

4.4.2.4.2 Diversidad β

El análisis multivariado del conjunto de datos se llevó a cabo utilizando la distancia de Bray-Curtis como medida de disimilitud, ampliamente utilizada en estudios de diversidad en ecología microbiana, no afectada por la presencia de valores nulos de abundancia de determinados OTUs. En base a la matriz de disimilitudes se llevó a cabo un escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) de manera tal de obtener un ordenamiento de las muestras en un espacio de dimensiones reducidas (dos dimensiones) en el que se preserve lo máximo posible el ranking de disimilitudes originales. El estrés del ordenamiento (*stress*-

value) fue evaluado para determinar el grado de concordancia entre el ranking de disimilitudes correspondiente a la configuración del ordenamiento y el ranking correspondiente a la matriz original. Valores mayores a 0,3 indican una representación pobre en el espacio de dimensiones reducidas mientras que valores menores a 0,1 se consideran como indicadores de una buena representación. En base a la matriz de disimilitudes de Bray-Curtis también se llevó a cabo un análisis de agrupamientos jerárquico utilizando el algoritmo UPGMA (Ramette, 2007).

De la misma manera que para el análisis de diversidad α , en el análisis de diversidad β se trabajó siempre con datos rarefaccionados al valor de la muestra con el menor número total de secuencias. Se utilizó un análisis multivariado de la variancia no paramétrico permutacional (NPMANOVA o ADONIS; Anderson, 2001) usando matrices de distancia (disimilitud Bray-Curtis) y 1000 permutaciones para estudiar la existencia de efectos estadísticamente significativos ($P < 0,05$) del método de finalización, de la fecha de muestreo como así también para evaluar la interacción (Ramette, 2007). En el caso particular del efecto de interacción, se realizó la misma consideración que la mencionada en la Sección 4.3.3 respecto del *P-value*. La homogeneidad de variancias multivariada entre los ocho tratamientos (definidos por la combinación de niveles de los dos factores, Tabla 19) se verificó mediante el procedimiento *betadisper* empleando un test de permutación para evaluar la significancia del modelo (999 permutaciones). Para comparar entre los dos métodos de finalización dentro de cada fecha de muestreo se utilizó el test ANOSIM (Sección 4.3.3). Para todos los análisis mencionados se utilizó el paquete VEGAN (Oksanen, 2015) del software estadístico R v.3.2.3 (R Development Core Team, 2016).

4.4.2.4.3 Composición de la comunidad bacteriana

Para el estudio de composición de la comunidad, se realizó un análisis univariado comparando cuantitativamente ambos métodos de finalización dentro de cada fecha de muestreo. Se compararon los valores de abundancia relativa a nivel de filo, clase, orden, familia y OTUs utilizando un test-t no paramétrico a un nivel de significación del 5% (White *et al.*, 2009) con 1000 permutaciones y la corrección Storey's FDR, según lo recomendado por Parks (2014). Para el análisis se utilizó el software estadístico STAMP (*Statistical Analysis of Metagenomic Profiles*) (Parks *et al.*, 2014). Dado que el software permite analizar la significancia de los efectos principales pero no de la interacción (método de finalización \times fecha de muestreo) se realizó la comparación entre los dos niveles del factor método (glifosato vs corte) mediante el test-t en cada fecha por separado. De lo contrario, de existir interacción, la influencia del factor fecha de muestreo impediría concluir sobre el efecto principal del método de finalización.

La comparación se llevó a cabo utilizando los datos rarefaccionados y aplicando un filtro de número mínimo de secuencias para cada característica (taxón) comparada de acuerdo con lo recomendado por el software STAMP (mayor a 5 secuencias). Al evaluar los resultados se tuvo en cuenta el tamaño del efecto (*effect size*) filtrando aquellos casos en los que éste resultó pequeño (Parks y Beiko, 2010). Se consideraron dos estadísticas de tamaño del efecto: relación de proporciones (*RP*) y diferencia de proporciones (*DP*), utilizando el operador lógico “OR” para filtrar aquellos casos en los que al menos uno de los dos estuvo por debajo del valor establecido como referencia (valor arbitrario). El valor mínimo establecido para *DP* y para *RP* fue 1,5, valor similar a los empleados en otros estudios (Mason *et al.*, 2012; Tavares *et al.*, 2016). La utilización de una estadística de tamaño del efecto (por ejemplo, relación de valores de abundancia relativa entre grupos comparados) permite evaluar la magnitud de la diferencia observada y considerar sólo aquellas diferencias que poseen relevancia biológica dentro de las múltiples diferencias reportadas en el perfil metagenómico, más allá de su significancia estadística (Parks y Beiko, 2010). Un efecto pequeño puede ser estadísticamente significativo cuando los tamaños muestrales son los suficientemente grandes. Asimismo, debe tenerse en cuenta que cuando los tamaños de los efectos son pequeños, los test estadísticos no serán sensibles a los sesgos sistemáticos que existen en la metodología utilizada para generar los perfiles taxonómicos (Parks, 2014). La significancia biológica debe ser apoyada por el tamaño del efecto. Entre las múltiples características de los perfiles metagenómicos que no posean significancia estadística podrían encontrarse algunas que posean relevancia biológica y que no estén siendo consideradas. El software STAMP ha sido desarrollado para realizar un análisis estadístico apropiado de perfiles metagenómicos complejos en base a estas consideraciones y a la consideración de diferentes métodos estadísticos, incluyendo el cálculo de tamaño de los efectos y de los intervalos de confianza para evaluar la significancia biológica de los resultados (Parks *et al.*, 2014).

4.4.3 PCR cuantitativa (qPCR) de bacterias totales, *Actinobacteria*, AOA y BOA

La cuantificación de bacterias totales, *Actinobacteria*, AOA y BOA se llevó a cabo mediante qPCR utilizando los procedimientos ya descritos en capítulos anteriores (véase Sección 4.4.2 del Capítulo 1 para bacterias totales, Sección 4.4.1 del Capítulo 2 para BOA, Sección 4.4.1 del Capítulo 3 para *Actinobacteria* y AOA). Tal como se mencionó en el Capítulo 2, la cuantificación del gen *amoA*_{BOA} brinda siempre una estimación del tamaño de las poblaciones de BOA (Kowalchuk y Stephen, 2001; Zabaloy *et al.*, 2017) dado que no todas las especies de BOA poseen el mismo número de copias, sino que la mayoría poseen

dos o tres copias. En el caso de AOA, en cambio, poseen sólo una copia (Kowalchuk y Stephen, 200; Okano *et al.*, 2004; Mincer *et al.*, 2007). Para *Actinobacteria* y BOA se calculó tanto la abundancia absoluta de los genes indicadores como así también la abundancia relativa de los mismos (AR), es decir, en relación al número de copias del gen del ARNr 16S de *Eubacteria* (BOA:bacterias totales, *Actinobacteria*:bacterias totales). Asimismo, también se calculó la abundancia del gen *amoA*_{BOA} en relación al gen *amoA*_{AOA} (AOA:BOA).

El análisis estadístico de los datos (Log_{10} número de copias μg^{-1} ADN y Log_{10} AR) se llevó a cabo mediante un ANOVA de dos factores ($\alpha=0,05$). Para el efecto de interacción en particular, se realizó la misma consideración que la mencionada anteriormente respecto del *P-value* (Sección 4.3.3). Se utilizó el test de Tukey HSD para comparación de medias ($\alpha=0,05$). Los supuestos de normalidad de residuos y de homocedasticidad fueron evaluados mediante el test de Shapiro-Wilks modificado y de Levene, respectivamente ($\alpha=0,05$). Asimismo, se realizaron comprobaciones gráficas (QQ-plot para normalidad y gráfico de residuos vs predichos para homocedasticidad). Para todos los análisis mencionados se utilizó software estadístico R v.3.2.3 (R Development Core Team, 2016).

4.4.4 PCR-DGGE de *Betaproteobacteria*

Para el análisis de la estructura de la comunidad de betaproteobacterias se llevó a cabo en primera instancia una PCR anidada y posteriormente una separación de los productos en un gel de poliacrilamida 9% con gradiente de urea-formamida (46,5 a 65%) como desnaturalizante.

La PCR inicial se llevó a cabo en dos pasos: en una primera reacción se utilizaron los cebadores específicos para *Betaproteobacteria* F948beta y R1494 (Tabla 20); en la segunda reacción, los productos diluidos de la PCR anterior se utilizaron como molde para una nueva amplificación pero utilizando el cebador directo F984 (junto con la extensión GC-clamp) y el cebador reverso R1378 (Tabla 20), de manera de introducir una extensión rica en GC que permite la correcta separación en el gel de poliacrilamida. En ambos casos, luego de la primera y segunda PCR, se corrieron geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio para verificar la presencia de una única banda del tamaño esperado. Las concentraciones finales de reactivos en la mezcla de reacción para la primera PCR fueron las siguientes: True Start buffer 1× (Thermo Scientific), dNTPs 0,2 mM, cloruro de magnesio 0,25 mM (Thermo Scientific), acetamida 4% P/V, cebadores 0,1 μM , albúmina sérica bovina 0,1 mg/ml, True Start Taq 0,125 U por reacción (Thermo Scientific) y agua milliQ en cantidad suficiente para 25 μl . Como templado se utilizaron diluciones 1/5 del ADN extraído de las muestras de suelo. El programa de PCR consistió en una etapa inicial de 7 min at 94°C

CAPÍTULO 4

seguida de 30 ciclos de: 1 min a 94°C, 1 min a 64°C y 2 min at 72°C. La etapa final de elongación fue de 10 min at 72°C. En la siguiente PCR se utilizaron diluciones 1/10 a 1/20 de los productos de PCR (dependiendo de la cantidad observada en gel de agarosa) como molde. Las concentraciones de reactivos para esta segunda PCR fueron: Go Taq Flexi buffer 1× (Promega), dNTPs 0,2 mM, cloruro de magnesio 0,25 mM, acetamida 4% P/V, cebadores 0,2 µM, Go Taq polimerasa 0,125 U por reacción (Promega) y agua milliQ en cantidad suficiente para 25 µl. El programa de amplificación utilizado fue el siguiente: desnaturalización inicial de 5 min a 94°C seguida de 25 ciclos de: 1 min a 94°C, 1 min a 53°C y 2 min at 72°C. La etapa final de elongación fue de 10 min a 72°C.

Tabla 20. Cebadores utilizados para el análisis de *Betaproteobacteria* mediante PCR seguido de electroforesis en gradiente de desnaturalizante (PCR-DGGE).

Cebador	Secuencia (5' – 3')	Referencia
F948β	CGCACAAGCGGTGGATGA	Gomes <i>et al.</i> (2001)
R1494	CTACGGRTACCTTGTTACGAC	Gomes <i>et al.</i> (2005)
F984	AACGCGAAGAACCTTAC	Heuer y Smalla (1997)
GC-clamp	CGCCCGGGGCGCGCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG	Nübel <i>et al.</i> (1996)
R1378	CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG	Heuer y Smalla (1997)

Antes de cargar los productos de PCR, se realizó una pre-corrida del gel durante 2 hs a 58°C (140 V) en el mismo sentido que la corrida final. Una vez finalizada, los productos de la segunda PCR (6 µl) fueron sembrados en el gel para iniciar la electroforesis durante 17 hs a 58°C y 140 V en un equipo *Ingeny PhorU System* (Ingeny, Goes, The Netherlands). Finalizada la corrida, se llevó a cabo la tinción del gel utilizando nitrato de plata como agente de tinción. Para ello, se siguió un protocolo de tinción ya optimizado en el mismo laboratorio donde se llevó a cabo la electroforesis (*Institute for Epidemiology and Pathogen Diagnostics*, Julius-Kühn Institut, Braunschweig, Alemania) que consistió en cinco pasos consecutivos: fijación, tinción, desarrollo, finalización y conservación. Para la fijación (2 veces, 10 min) se utilizó una solución compuesta por 10 ml de ácido acético glacial, 200 ml de etanol absoluto y 1790 ml de agua milliQ. La tinción (15 min) se llevó a cabo con una solución de nitrato de plata 0,2% P/V preparada en el momento y luego el gel fue lavado dos veces (1 min) con agua milliQ. Para la etapa de desarrollo se utilizaron 100 ml de una solución 1,5% P/V de hidróxido de sodio junto con 800 µl de formaldehido 37% V/V y la duración fue de

aproximadamente 10 min controlando que no haya tinción excesiva mediante comparación de las muestras con el marcador. Para finalizar el desarrollo se utilizó una solución de carbonato de calcio 0,75% P/V durante 10 min. La conservación se realizó con etanol 25% V/V más glicerina 10% V/V durante 7 min cubriendo el gel con film plástico para lograr el humedecimiento. Finalmente se dejó secar el gel suspendido en posición vertical durante tres días a temperatura ambiente. La digitalización del gel se llevó a cabo utilizando un escáner Epson Perfection V700 Photo.

Los perfiles obtenidos fueron analizados mediante el software Gel Compare IITM v 4.6 (Applied Maths, Kortrijk Bélgica) mediante un análisis de agrupamientos (*clusters*) utilizando el coeficiente de correlación de Pearson (r) y el algoritmo de agrupamiento UPGMA con previa optimización de los perfiles. Los valores óptimos ingresados para la sustracción del *background* ("*background scale*") y el filtrado ("*Wiener cut-off*") fueron los calculados por el software (GelCompar IITM v. 4.6, *Software Manual*). Se sembraron marcadores en cada extremos del gel conteniendo múltiples fragmentos de diversos tamaños, designados como posiciones internas de referencia para la normalización del gel (GelCompar IITM v. 4.6, *Software Manual*). En base a la matriz de similitudes (valores de similitud entre pares de calles del gel) se aplicó un test de permutación (10^3 permutaciones al azar) a un nivel de significación del 5% según lo recomendado por Kropf *et al.* (2004) para evaluar los efectos del método de finalización y de la fecha de muestreo como así también para comparar entre métodos dentro de una determinada fecha de muestreo. Al mismo tiempo, se realizó un análisis complementario en donde se utilizó el software mencionado para identificar los *clusters* presentes a un 60% de similitud (*cut-off*) y con un 100% de estabilidad interna (método Jackknife basado en similitudes promedio). El valor de *cut-off* en dicho caso se seleccionó en base a valores similares de otros estudios (Montecchia *et al.*, 2009).

4.4.5 Análisis molecular de elementos genéticos móviles

Los análisis de EGMs que se describen a continuación, de la misma manera que el análisis de *Betaproteobacteria* mediante PCR-DGGE (sección anterior), fueron realizados durante una estadía de investigación doctoral en Julius-Kühn Institut (*Institute for Epidemiology and Pathogen Diagnostics*, Julius-Kühn Institut, Braunschweig, Alemania).

4.4.5.1 Cuantificación de plásmidos IncP-1

La cuantificación de plásmidos de amplio rango de hospedador IncP-1 se llevó a cabo mediante qPCR utilizando el mismo protocolo descripto y optimizado por Jechalke *et al.* (2013) que permite detectar los plásmidos IncP-1 de los seis subgrupos (α , β , δ , γ , ϵ , ζ) de forma rápida y sensible, más allá de la diversidad de los *backbones* de estos plásmidos. El

CAPÍTULO 4

gen blanco amplificado fue el gen *korB* y se utilizaron en la misma reacción de PCR dos cebadores directos (F y Fz) junto a tres cebadores reversos (R, Rge, Rd). En conjunto estos cebadores cubren todas las variantes conocidas de plásmidos IncP-1 pertenecientes a los seis subgrupos (Tabla 21). Se utilizó el sistema TaqMan con las sondas P y Pgz (Tabla 22). Como estándar se empleó un fragmento del gen *korB* inserto en un vector pGEM®-T (4,22.10¹⁰ moléculas/5 µl de estándar), el cual fue amplificado a partir del plásmido pKJK5 (IncP-1 ε). Se prepararon diluciones decimales (10⁻¹ a 10⁻⁸) del plásmido con el inserto. Se utilizó un equipo de PCR en tiempo real Bio-Rad CFX Connect junto con el software Bio-Rad CFX Manager para la visualización de las curvas de amplificación y el de la curva de calibrado (Bio-Rad, Munich, Alemania).

Tabla 21. Cebadores utilizados en las reacciones de PCR cuantitativa (qPCR) para el análisis de elementos genéticos móviles. Se indica el tamaño del producto amplificado.

Cebadores	Secuencia (5' – 3')	Gen	Tamaño (pb)	Referencias
F	TCATCGACAACGACTACAACG	<i>korB</i>	Variable	Jechalke <i>et al.</i> (2013)
R	TTCTTCTTGCCCTTCGCCAG			
Fz	TCGTGGATAACGACTACAACG			
Rge	TTYTTCYTGCCCTTGGCCAG			
Rd	TTCTTGACTCCCTTCGCCAG			
intl1-LC1	GCCTTGATGTTACCCGAGAG	<i>intl1</i>	196	Barraud <i>et al.</i> (2010)
intl1-LC5	GATCGGTCTGAATGCGTGT			
Bact1369F	CGGTGAATACGTTTCYCGG	<i>ARNr 16S</i>	460	Suzuki <i>et al.</i> (2000)
Prok1492R	GGWTACCTTGTTACGACTT			

Tabla 22. Sondas del sistema TaqMan utilizadas en las reacciones de PCR cuantitativa (qPCR) para el análisis de elementos genéticos móviles.

Sondas ^a	Secuencia (5' – 3')	Gen	Referencias
P	TCAGYTCRTTGCGYTGCAAGTTCTCVAT	<i>korB</i>	Jechalke <i>et al.</i> (2013)
Pgz	TSAGGTCGTTGCGTTGCAGGTTYTCAAT	<i>korB</i>	
TM1389F	CTTGACACACCGCCCGTC	<i>ARNr 16S</i>	Suzuki <i>et al.</i> (2000)
intl1	ATTCCTGGCCGTGGTTCTGGGTTTT	<i>intl1</i>	Barraud <i>et al.</i> (2010)

^a Marcación de la sonda: 5' 6-carboxifluoresceína (FAM), 3' 6-carboxitetrametilrodamina (TAMRA).

4.4.5.2 Cuantificación de integrones de clase I

Para la cuantificación de integrones de clase I se utilizó el protocolo de PCR cuantitativa descrito por Barraud *et al.* (2009), dirigido al gen de la integrasa (*intI1*), utilizando la tecnología TaqMan y los cebadores *intI1*-LC1 y *intI1*-LC5 (Tabla 21) junto con la sonda *intI1* (Tabla 22). Asimismo, se utilizó el protocolo descrito por Suzuki *et al.* (2000) para calcular el número de copias del gen que codifica para el ARNr 16S, empleando los cebadores Bact1369F y Prok1492R junto con la sonda TM1389F (TaqMan). Las copias en ambos casos fueron calculadas por µg de ADN y se expresaron en forma relativa (*intI1*:ARNr 16S). Para la cuantificación de *intI1* se utilizó como estándar un fragmento del gen *intI1* inserto en el vector pGEM®-T (3,92.10¹⁰ moléculas/5 µl), el cual fue amplificado a partir del plásmido pKJK5 (IncP-1 ε). Se incluyeron 5 diluciones decimales (10⁻⁴ a 10⁻⁸) del estándar.

La comparación estadística de las medias de los dos métodos de finalización (corte vs glifosato) en las diferentes fechas de muestreo se llevó a cabo mediante un test-t para muestras independientes a un nivel de significación del 5% utilizando el software estadístico R v3.2.3. La normalidad de los datos se verificó mediante el test de Shapiro-Wilks modificado (α=0,05).

4.4.5.3 Detección de plásmidos IncP-1 mediante PCR-Southern blot

Para la detección de plásmidos IncP-1 α, β y ε mediante Southern blot, se llevó a cabo inicialmente una PCR con los cebadores *trfA*733f y *trfA*1013r (Tabla 23) que amplifican el gen *trfA* de este grupo de plásmidos (Bahl *et al.*, 2009), utilizando como control positivo el plásmido R751 (IncP-1 β).

Tabla 23. Cebadores utilizados para PCR-Southern Blot de plásmidos IncP-1. Se indica el tamaño del producto amplificado.

Cebadores	Secuencia (5' – 3')	Gen	Tamaño (pb)	Referencia
trfA733f	TTCACSTTCTACGAGMTKTGCCAGGAC	trfA (IncP-1 α, β, ε)	281	Bahl et al. (2009)
trfA1013r	GWCAGCTTGCGGTACTTCTCCCA			
trfA d-F	TTCACGTTCTACGAGCTTTGCACAGAC	trfA (IncP-1 δ)	281	
trfA d-r	GACAGCTCGCGGTACTTTTCCCA			

Las concentraciones de reactivos para esta PCR fueron las siguientes: True Start buffer 1× (Thermo Scientific), cebadores 0,6 µM, cloruro de magnesio 2,5 mM, True Start Taq 0,625 U por reacción (Thermo Scientific) y agua milliQ en cantidad suficiente para 25 µl. Como templado se utilizó 1 µl de ADN. El programa de amplificación utilizado fue el

CAPÍTULO 4

siguiente: etapa inicial de 5 min a 94°C, 30 ciclos de: 30 s a 94°C, 20 s a 60°C, 20 s a 72°C, y una etapa final de elongación de 5 min a 72°C.

Los productos de PCR (10 µl) fueron corridos en un gel de agarosa 1% junto con el marcador DIG VII (Roche Applied Science). Se sembraron en total tres de las cuatro réplicas de cada tratamiento (28 muestras en total) de modo de poder incluir el mayor número de muestras en un mismo gel junto con los controles y las calles separadoras requeridas, de acuerdo a la capacidad del equipo de electroforesis disponible. De esta manera, se sembraron dos geles con 12 muestras cada uno, donde cada gel incluyó los dos métodos de finalización y dos fechas de muestreo. Para una misma fecha de muestreo se tuvo en cuenta siempre la inclusión en un mismo gel de los dos métodos de finalización de forma tal de poder compararlos. Luego de la electroforesis (70 V, 1 hora), se realizó una transferencia por capilaridad a una membrana de nylon Hybond-N+ (Amersham Biosciences) usando el buffer de transferencia 20× SSC buffer (citrato de sodio 0,3 M, cloruro de sodio 3 M, pH 7.0) durante 16 horas (Sambrook y Russell, 2001). Los fragmentos de PCR fueron transferidos a la membrana fueron fijados a la misma mediante una incubación de 2 hs a 80°C y posteriormente hibridados con la sonda correspondiente. La hibridación se llevó a cabo en un buffer de astringencia media (homología 75-100%) (SSC 5X, formamida 20% V/V, agente bloqueador 2% P/V, N- laurilsarcosina de sodio 0,1% P/V y dodecilsulfato sódico 0,02% P/V). Luego las membranas fueron lavadas dos veces durante 5 min en una solución de astringencia baja (SSC 2X, dodecilsulfato sódico 0,1% P/V) a temperatura ambiente en un agitador de rolado y balanceo. Una vez finalizado dicho lavado se lavaron en una solución de astringencia alta (SSC 0,1X, dodecilsulfato sódico 0,1% P/V) dos veces durante 15 min a 68°C en una incubadora con movimiento giratorio.

La hibridación de las membranas se llevó a cabo con sondas quimioluminiscentes CDP-Star marcadas con digoxigenina de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Roche Diagnostic, Mannheim, Alemania). En una primera hibridación se evaluó la presencia conjunta de plásmidos IncP-1 α , β y ϵ empleando una mezcla (*pool*) que contenía sondas específicas para todos los subgrupos (IncP-1 α , β , γ , δ , ϵ , ζ). Por lo tanto, los plásmidos que se detectaron podían corresponder a alguno de los tres subgrupos α , β o ϵ , o bien a todos los subgrupos, sin poder diferenciar a qué subgrupos específicamente correspondía la señal observada. No obstante, luego de realizar transferencias de los productos a nuevas membranas, se utilizaron sondas específicas para el subgrupo β y para el subgrupo ϵ .

En el caso de la detección del subgrupo δ , los productos fueron amplificados por PCR utilizando un par de cebadores diferente al utilizado para los subgrupos α , β y ϵ . Los cebadores empleados fueron trfA d-F y trfA d-r (Tabla 23). Las concentraciones de reactivos

CAPÍTULO 4

utilizadas y el programa de amplificación fueron los mismos que los mencionados anteriormente para los subgrupos α , β y ϵ .

El procedimiento de detección se llevó a cabo utilizando las siguientes soluciones: DIG1 (100 mM ácido maleico, 150 mM cloruro de sodio pH 7,5), DIG3 (100 mM Tris ácido clorhídrico, 100 mM cloruro de sodio pH 9,5), agente de bloqueo (caseína, 10% en solución DIG1), Buffer 1 (DIG1 + 0,3% Tween 20), Buffer 2 (1% agente de bloqueo en DIG1), anticuerpo (Roche, anti digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina), Buffer 3 (Buffer 2 + anticuerpo en una relación 1:10000). Como sustrato de la enzima se utilizó CDP-Star (Roche, listo para su uso). El protocolo de detección se describe a continuación. En primer lugar cada membrana fue lavada durante 5 min a temperatura ambiente con 50 ml de Buffer 1. A continuación se realizó el bloqueo durante 30 min a temperatura ambiente utilizando 100 ml de Buffer 2. Una vez finalizado el período de bloqueo, la membrana se expuso al anticuerpo (20 ml, 30 min a temperatura ambiente). Posteriormente la membrana se lavó dos veces (15 min) con 100 ml de Buffer 1 a temperatura ambiente para remover el exceso de anticuerpo, y finalmente se expuso la membrana al Buffer 3 (20 ml, dos veces durante 5 min) para modificar el pH y activar la enzima. En todos los casos se realizaron las incubaciones en agitación mediante agitador de rolado y balanceo. Una vez finalizados los pasos anteriores, se colocó la membrana dentro de láminas de papel plástico y se colocaron 900 μ l de CDP-Star incubando 5 min a temperatura ambiente. El exceso de sustrato fue removido y la membrana contenida en las láminas de plástico fue sellada al vacío. El revelado se llevó a cabo mediante autoradiografía.

La digitalización de las membranas luego de la autoradiografía se llevó a cabo utilizando un escáner Epson Perfection V700 Photo.

5. Resultados

5.1 Análisis fisiológico de comunidades microbianas

5.1.1 Utilización de sustratos carbonados

El ACP del conjunto de datos (AUC) obtenidos a partir de las mediciones de respiración inducida con cada uno los nueve sustratos en las 32 muestras de suelo rizosférico (dos métodos x cuatro fechas de muestreo x cuatro réplicas, Tabla 19), indicó una clara separación entre los dos métodos de finalización (corte vs glifosato) a los 26 días (puntos 25-28 y 29-32) y también, en menor medida, a los 4 días (puntos 1-4 y 5-8) (elipses, Figura 25).

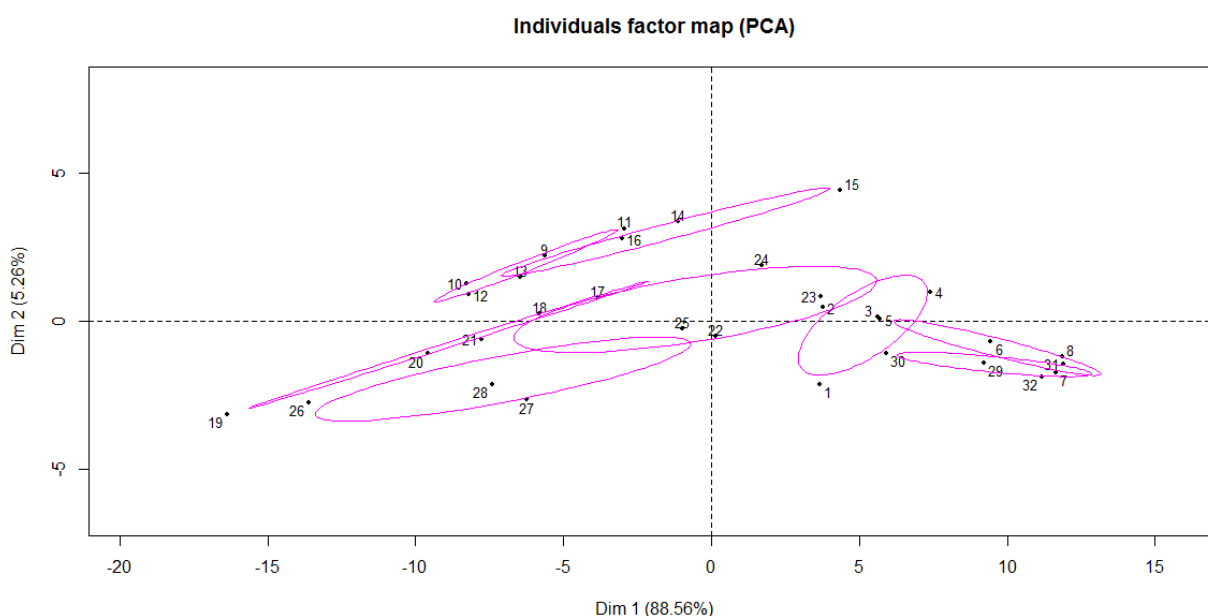


Figura 25. Análisis de componentes principales (ACP) de perfiles fisiológicos multivariados correspondientes a los diferentes tratamientos. Las elipses violetas corresponden a elipses de confianza (95%) para cada uno de los tratamientos (método de finalización x fecha de muestreo). **1-4:** Corte/4 días; **5-8:** Glifosato/4 días; **9-12:** Corte/10 días; **13-16:** Glifosato/10 días; **17-20:** Corte/17 días; **21-24:** Glifosato/17 días; **25-28:** Corte/26 días; **29-32:** Glifosato/26 días.

La componente principal 1 (CP1 o Dim1) explica un amplio porcentaje (88,56%) de la variancia total de los datos reflejando su contribución mayoritaria al ordenamiento observado. Junto con la componente principal 2 (CP2), las dos componentes explican más de un 90% de la variancia total, permitiendo un ordenamiento adecuado del conjunto de datos multivariados. La CP1 puede considerarse, de acuerdo a la similitud de las contribuciones de las diferentes variables (Anexo IV, Tabla 56, Figura 53), como un indicador o índice promedio de utilización de los sustratos carbonados.

CAPÍTULO 4

El análisis estadístico mediante el test ADONIS (NPMANOVA) sobre estos mismos datos multivariados indicó una interacción estadísticamente significativa entre ambos factores ($P < 0,05$, Tabla 24), justificando la comparación de los métodos de finalización para cada fecha de muestreo por separado (Tabla 25). La separación observada en el ordenamiento de la Figura 25 fue confirmada en el análisis ANOSIM, el cual indicó una separación estadísticamente significativa entre ambos métodos sólo en la última fecha de muestreo (Tabla 25).

Tabla 24. Análisis multivariado de la variancia no paramétrico (NPMANOVA) para el conjunto de datos de perfiles fisiológicos en los diferentes tratamientos. Los resultados corresponden al análisis ADONIS con 10^3 permutaciones. M=método de finalización; S=fecha de muestreo; MxS= interacción. *gl*: grados de libertad. Valores de $P < 0,05$ indican significancia estadística.

NPMANOVA (ADONIS)	
M	$P < 0,001$ ($F=27,65$; $gl=1$)
S	$P < 0,001$ ($F=13,08$; $gl=3$)
MxS	$P=0,037$ ($F=3,31$; $gl=3$)
<i>gl</i> error	24

Tabla 25. Comparación de perfiles fisiológicos multivariados entre métodos de finalización dentro cada fecha de muestreo. Se utilizó el análisis de similitudes (ANOSIM) con 999 permutaciones.

ANOSIM (Corte vs Glifosato)				
	4 días	10 días	17 días	26 días
Significancia	0,062	0,17	0,15	0,029
<i>R-Statistic</i>	0,44	0,10	0,23	0,68

La Figura 26 corresponde a la representación de las variables y de las observaciones en el espacio definido por las componentes principales (*biplot*). Puede apreciarse claramente que todas las variables tienen una fuerte correlación positiva con la CP1. Las observaciones correspondientes a 10 y 17 días (puntos 9-16 y 17-24, respectivamente) se distribuyen sobre el eje negativo de la CP1. Asimismo, las observaciones correspondientes al muestreo del día 26 del método de corte (25-28) también se ubican en el eje negativo de la CP1, mientras que las del tratamiento con glifosato (29-32) se ubican sobre el eje positivo de esta componente. La tendencia observada a lo largo de las cuatro fechas indica que en el método de corte el uso de los sustratos por parte de la comunidad microbiana se reduce desde la fecha inicial de muestreo (día 4) hasta los 26 días, mientras que en el método con glifosato ocurre una disminución en fechas intermedias (10 y 17 días) pero luego a los 26 días la respuesta fisiológica se aproxima a la respuesta más temprana (4 días).

En el *biplot* de la Figura 26 se observa también que las comunidades microbianas de la rizosfera de plantas tratadas con glifosato al inicio y al final del muestreo (G.4D y G.26D) presentan mayor utilización del sustrato sarcosina comparado con el resto de los sustratos y con el resto de las muestras. La relevancia biológica de esta observación, posiblemente relacionada con la degradación biológica de glifosato en la rizosfera, se discutirá en la Sección 6.

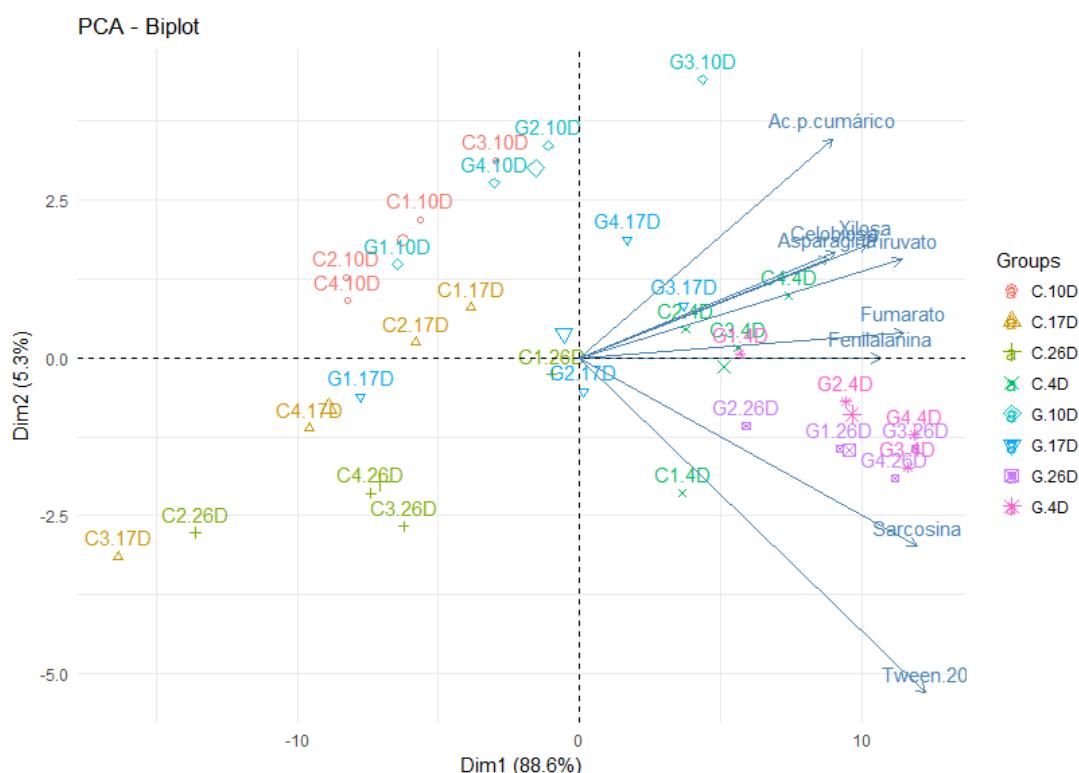


Figura 26. Representación de las variables y observaciones en el análisis de componentes principales (ACP) de perfiles fisiológicos. La representación corresponde al *biplot* basado en la matriz de variancias-covariancias. Las variables se encuentran indicadas mediante vectores azules mientras que las observaciones se indican en diferentes colores y símbolos de acuerdo con el tratamiento correspondiente (leyenda “Groups”). La letra C indica el método de corte y la letra G el método con glifosato. El número luego de las letras indica la réplica, mientras que el número después del punto indica la fecha de muestreo (.4D: 4 días; .10D: 10 días; .17D: 17 días; .26D: 26 días).

Como se indicó anteriormente, los valores de contribución a la CP1 para las distintas variables fueron similares, observándose una fuerte correlación con dicha componente (valores mayores a 0,88; Anexo IV, Tabla 56). Los ácidos orgánicos (ácido fumárico y ácido pirúvico) mostraron los valores más altos de correlación con la CP1 (mayores al 95%), seguido de los aminoácidos (asparagina, fenilalanina y sarcosina), luego los carbohidratos y finalmente Tween 20 y ácido *p*-cumárico. En cambio, la correlación con la CP2 fue notablemente inferior para todas las variables. En este caso, la mayor correlación se observó para Tween 20 y sarcosina (negativa) y para el ácido *p*-cumárico (positiva) (Anexo

IV, Tabla 56). Finalmente, a partir de la información obtenida mediante el ACP, es importante destacar que sarcosina y Tween 20 presentan claramente una mayor correlación entre sí que con el resto de las variables (Anexo IV, Tabla 57, Figura 54).

En lo que respecta específicamente a las medidas de respiración inducidas por los diferentes sustratos en el análisis univariado, los perfiles mostraron diferencias entre ambos métodos de finalización principalmente en la última fecha de muestreo (Figura 27).

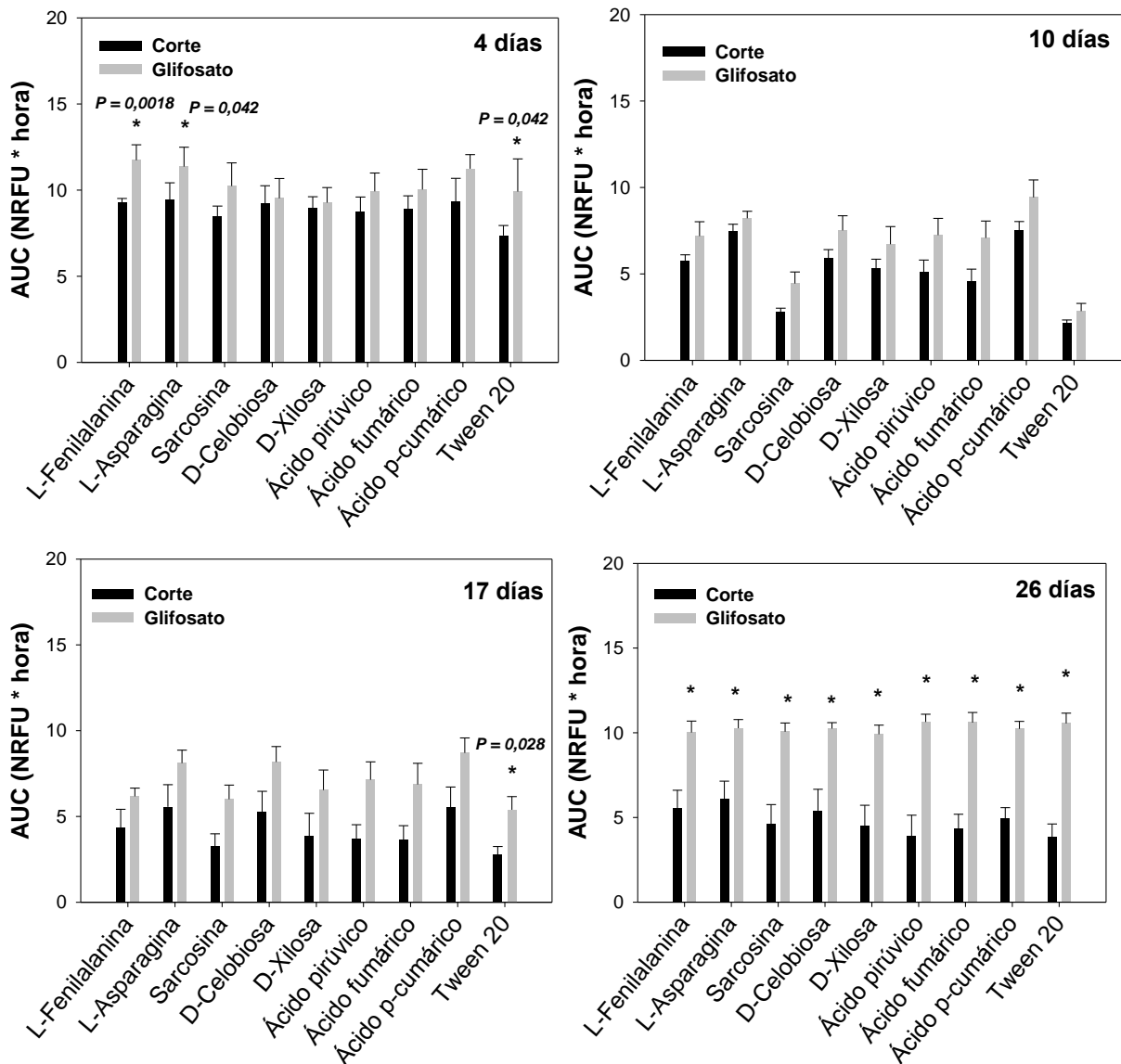


Figura 27. Perfiles fisiológicos de comunidades microbianas a partir de medidas de respiración inducida por diferentes sustratos (SIR). Se indica el área integrada bajo la curva respiratoria (AUC) para ambos métodos de finalización (corte y glifosato). Las barras de error corresponden al error estándar de la media ($n=4$). Se indican los valores de probabilidad asociada para aquellos sustratos que mostraron diferencias significativas (asterisco, test-t para muestras independientes, $P<0,05$). Los valores de probabilidad asociada para 26 días se encuentran indicados en la Tabla 26 para simplificar la visualización de datos en el gráfico. NRFU: unidades de fluorescencia relativa normalizada.

CAPÍTULO 4

Para todos los sustratos evaluados, se observó un notable y significativo incremento en el consumo de oxígeno (NRFU*hora) a los 26 días bajo el método de finalización con glifosato. Los incrementos relativos (Glifosato:Corte) se indican en la Tabla 26. Como se observa en la Figura 27, Tween 20 fue el único sustrato que mostró diferencias significativas entre métodos de finalización en tres fechas de muestreo (4, 17 y 26 días). Los aminoácidos se diferenciaron del resto por ser los únicos que muestran diferencias significativas tempranas (4 días) y tardías (26 días).

Tabla 26. Respiración inducida por los sustratos a los 26 días post-tratamiento. Se indican los valores de área integrada bajo la curva respiratoria (AUC) para ambos métodos de finalización (corte y glifosato) como así también la relación entre ambos (Glifosato:Corte). Fen: fenilalanina; Asp: asparagina; Sar: sarcosina; Cel: celobiosa; Xil: xilosa; Pir: ácido pirúvico; Fum: ácido fumárico; Cum: ácido *p*-cumárico; Tween: Tween 20. Los valores de probabilidad asociada corresponden a la comparación mediante el test-t para muestras independientes. Valores de $P < 0,05$ indican diferencias estadísticamente significativas entre métodos de finalización. NRFU: unidades de fluorescencia relativa normalizada.

	Fen	Asp	Sar	Cel	Xil	Pir	Fum	Cum	Tween
Corte (NRFU*hora)	5,51	6,09	4,60	5,40	4,50	3,88	4,33	4,92	3,83
Glifosato (NRFU*hora)	10,02	10,26	10,06	10,25	9,92	10,64	10,61	10,23	10,56
Glifosato:Corte	1,82	1,69	2,19	1,90	2,20	2,74	2,45	2,08	2,76
P-value	0,013	0,012	0,005	0,01	0,0066	0,0023	0,001	0,0005	0,0005

5.1.2 Diversidad funcional y análisis de cocientes respiratorios

La diversidad catabólica se estudió mediante el cálculo de la equitatividad de uso de sustratos (E) y mediante el índice de diversidad de Shannon-Weaver (H'). El parámetro E constituye sólo una medida parcial de la diversidad catabólica que se compone no sólo de la equitatividad sino también de la riqueza. En este caso, no se observaron diferencias en la riqueza dado que para todos los sustratos analizados se observó respuesta respiratoria (incremento de NRFU vs tiempo), es decir, todos fueron utilizados en los distintos tratamientos estudiados. El análisis estadístico para ambos parámetros indicó una interacción significativa para E y marginalmente significativa para H' (Tabla 27), comparándose entonces los métodos de finalización en cada fecha de muestreo por separado. Sólo se observó una diferencia significativa entre métodos a los 26 días (Figura 28). De la misma manera, se compararon las fechas de muestreo dentro de cada método de finalización. Las comparaciones múltiples indicaron que en ambos métodos existe una

CAPÍTULO 4

reducción significativa de los parámetros a los 10 días respecto de la fecha inicial de muestreo. Sin embargo, mientras que en el método con glifosato se observa una recuperación (no hay diferencias significativas entre 4 y 26 días), en el método de corte ello no ocurre y los parámetros adquieren un valor significativamente menor al momento del muestreo final respecto del inicial. Esta tendencia es similar a la observada en el ACP presentado anteriormente, tal como se discutirá en la Sección 6.

Tabla 27. Análisis de la variancia (ANOVA) para parámetros de diversidad funcional. Se indican los valores de probabilidad asociada para los efectos principales (M=método de finalización y S=fecha de muestreo) como así también para la interacción entre ambos factores (M×S), tanto para la diversidad (índice de Shannon-Weaver) como para la equitatividad de uso de sustratos (E). gl: grados de libertad. Valores de $P<0,05$ indican significancia estadística.

ANOVA	Equitatividad (E)	Shannon-Weaver (H')
M (gl=1)	$P=0,0001$ ($F=20,61$)	$P=0,0003$ ($F=18,21$)
S (gl=3)	$P<0,0001$ ($F=39,84$)	$P<0,0001$ ($F=39,59$)
M×S (gl=3)	$P=0,027$ ($F=3,64$)	$P=0,052$ ($F=2,96$)
gl error	24	24

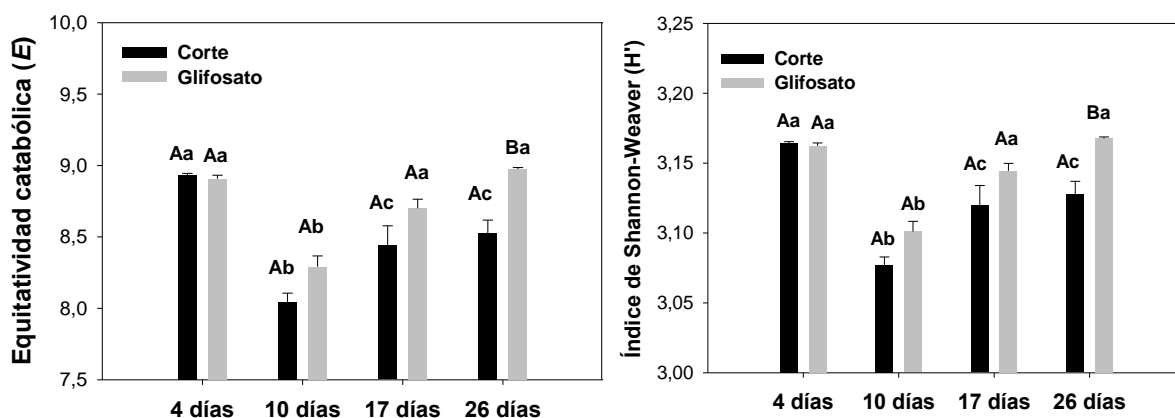


Figura 28. Parámetros de diversidad funcional de las comunidades microbianas. Se indica la equitatividad de uso de sustratos (E) y el índice de diversidad de Shannon-Weaver (H') para cada tratamiento. Las barras de error corresponden al error estándar de la media ($n=4$). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los dos métodos de finalización dentro de cada fecha de muestreo. Letras minúsculas diferentes indican diferencias entre fechas de muestreo dentro de un mismo método de finalización ($P<0,05$; Test de Tukey HSD).

Para el ácido *p*-cumárico, se calculó el cociente respiratorio ($RQ_{\text{Ácido } p\text{-cumárico}}$) correspondiente a ambos métodos de finalización en las diferentes fechas de muestreo. La inclusión de este indicador se consideró en base a los resultados obtenidos previamente en

el Capítulo 2, donde se determinó que en suelo no rizosférico las aplicaciones repetidas del IA y del FC conducen a un incremento del $RQ_{\text{Ácido } p\text{-cumárico}}$. Como se observa en la Tabla 28, en este caso para suelo rizosférico el análisis estadístico indicó una interacción marginalmente significativa. En la Figura 29 se indican las comparaciones entre métodos dentro de cada fecha de muestreo y entre las distintas fechas para cada método. En ninguna fecha se observó una diferencia significativa entre métodos de finalización ($P>0,05$).

Tabla 28. Análisis de la variancia (ANOVA) para el cociente respiratorio del ácido p -cumárico ($RQ_{\text{Ácido } p\text{-cumárico}}$). Se indican los valores de probabilidad asociada para los efectos principales (M=método de finalización y S=fecha de muestreo) como así también para la interacción entre ambos factores (MxS). *gl*: grados de libertad. Valores de $P<0,05$ indican significancia estadística.

ANOVA	$RQ_{\text{Ácido } p\text{-cumárico}}$
M (<i>gl</i> =1)	$P=0,84$ ($F=0,042$)
S (<i>gl</i> =3)	$P<0,0001$ ($F=51,24$)
MxS (<i>gl</i> =3)	$P=0,052$ ($F=2,97$)
<i>gl</i> error	24

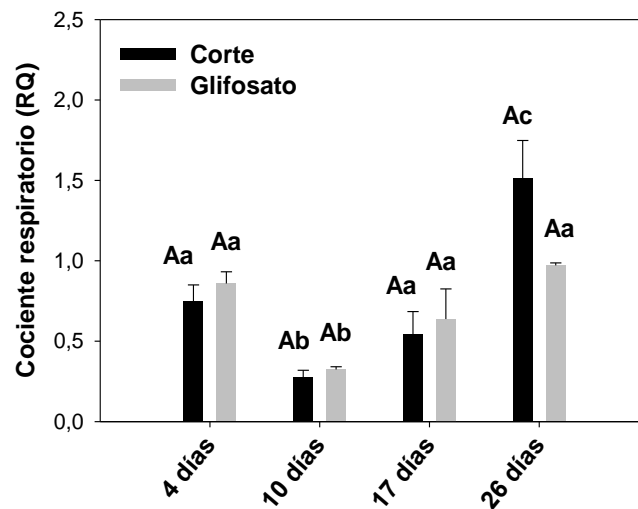


Figura 29. Cociente respiratorio (RQ) con ácido p -cumárico como sustrato. El cociente corresponde a la relación entre la respiración basal (RB) y la respiración inducida por el ácido p -cumárico (SIR). Las barras de error corresponden al error estándar de la media ($n=4$). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los dos métodos de finalización dentro de cada fecha de muestreo. Letras minúsculas diferentes indican diferencias entre fechas de muestreo dentro de un mismo método de finalización ($P<0,05$, Test de Tukey HSD).

Finalmente, en la Figura 30 se presentan los resultados de las respuestas respiratorias (SIR) de las comunidades microbianas en presencia de exudados radicales (Ex_G y Ex_C) obtenidos en cada fecha de muestreo. Como se observa en la Figura 30A, a partir de los 10 días (y hasta los 26 días) las comunidades microbianas rizosféricas de plantas sujetas al

método de corte presentan una respuesta significativamente mayor para el Ex_G en relación al Ex_C ($P < 0,05$). En cambio, en las comunidades microbianas de plantas expuestas al método con glifosato se observa dicha tendencia pero sólo hasta los 17 días. A los 26 días, la respuesta disminuye en presencia del Ex_G en lugar de incrementarse (Figura 30B), contrariamente a lo observado en comunidades microbianas del método de corte (Figura 30A).

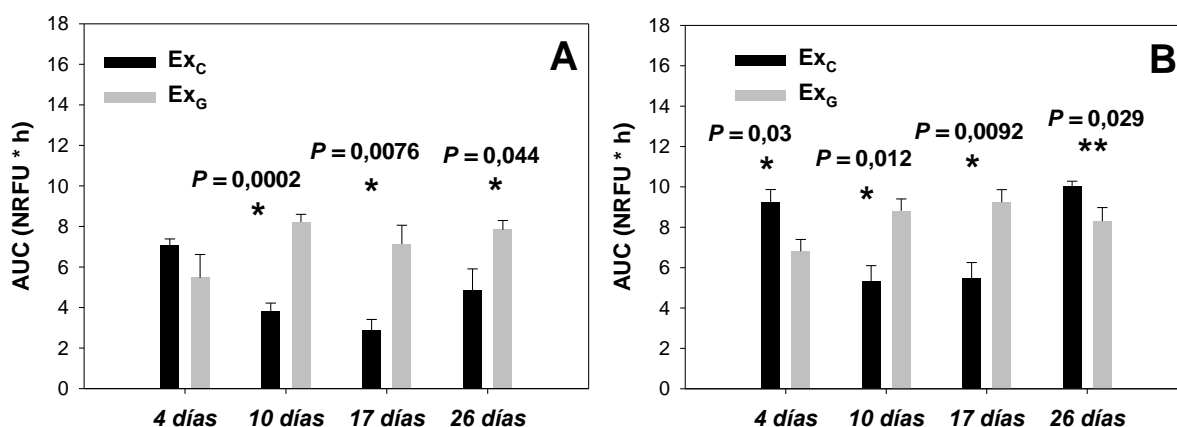


Figura 30. Respuestas respiratorias inducidas por los exudados radicales en cada método de finalización y en las distintas fechas de muestreo. Se indica el área integrada bajo la curva respiratoria (AUC) para comunidades microbianas del método de corte (A) y del método de finalización con glifosato (B) en presencia de exudados obtenidos de plantas cortadas (Ex_C) o secadas con glifosato (Ex_G). Las barras de error corresponden al error estándar de la media ($n=4$). Los asteriscos simples indican diferencias significativas entre las medias ($P < 0,05$, Test-t para muestras independientes). El asterisco doble indica diferencia significativa mediante test de Wilcoxon ($P < 0,05$). NRFU: unidades de fluorescencia relativa normalizada.

5.2 Análisis molecular de comunidades microbianas

5.2.1 Barcoded amplicon-sequencing

Como se mencionó en la Sección 4.4.2, sólo se analizaron las muestras correspondientes a la primera y a la última fecha de muestreo (4 y 26 días) mediante secuenciación de amplicones del gen del ARNr 16S. Se obtuvieron un total de 46239 secuencias (*pyrotags*) con una extensión promedio de 288 nucleótidos luego de la eliminación de los *barcodes* y de los cebadores, incluyendo las correspondientes a Bacteria y Arquea. El número de unidades operativas taxonómicas (OTUs) definidas luego del procesamiento y limpieza del conjunto total de datos (12 muestras) fue de 2063 para Bacteria+Arquea, de los cuales 1821 fueron clasificados como pertenecientes a Bacteria (88,2% de los OTUs), 240 a Arquea (11,6%) y 2 OTUs (0,097%) no pudieron ser asignados a ninguno de ellos. En la Tabla 29 se indican el número de secuencias obtenidas (correspondientes a Arquea y Bacteria) para cada una de las muestras. Los valores reportados en la tabla corresponden a los datos no

CAPÍTULO 4

rarefaccionados. Dado que se observa una dominancia de Bacteria (alrededor de un 90%) en los metagenomas de todas las muestras comparado con el bajo porcentaje de Arquea (alrededor de un 10%), los análisis posteriores se centraron únicamente en este dominio. Asimismo estudios recientes indican que los cebadores universales para procariotas, tales como el par aquí utilizado (515F-806R), no son adecuados para el estudio de Arquea dada su limitada capacidad de capturar la diversidad de estos microorganismos respecto de otros cebadores. Este aspecto se retomará en la Sección 6.

Tabla 29. Número de secuencias (sec.) obtenidas mediante secuenciación de amplicones del gen del ARNr 16S. Los valores corresponden a los datos sin rarefacción.

Muestra	Número de sec. Bacteria	Número sec. de Arquea	Número sec. sin asignación	Número total de sec.	% sec. Bacteria	% sec. Arquea	% sec. sin asignación
C1.4D	4163	370	0	4533	91,84	8,16	0
C2.4D	3446	281	2	3729	92,41	7,54	0,05
C3.4D	2084	184	0	2268	91,89	8,11	0
G1.4D	2412	137	1	2550	94,59	5,37	0,04
G2.4D	4223	407	1	4631	91,19	8,79	0,02
G3.4D	3339	276	2	3617	92,31	7,63	0,06
C1.26D	2496	348	0	2844	87,76	12,24	0
C2.26D	1766	224	0	1990	88,74	11,26	0
C3.26D	4489	375	0	4864	92,29	7,71	0
G1.26D	3725	328	0	4053	91,91	8,09	0
G3.26D	5061	422	2	5485	92,27	7,69	0,04
G4.26D	5153	518	4	5675	90,80	9,13	0,07

Los datos rarefaccionados correspondientes a Bacteria fueron los que se emplearon posteriormente para los correspondientes análisis de diversidad α y β , como así también para las comparaciones de abundancia relativa (filo, clase, orden, familia, OTUs) entre métodos de finalización. La rarefacción se llevó a cabo en base a la muestra con el menor número de secuencias, en este caso C2.26D (1766 secuencias) (Figura 31).

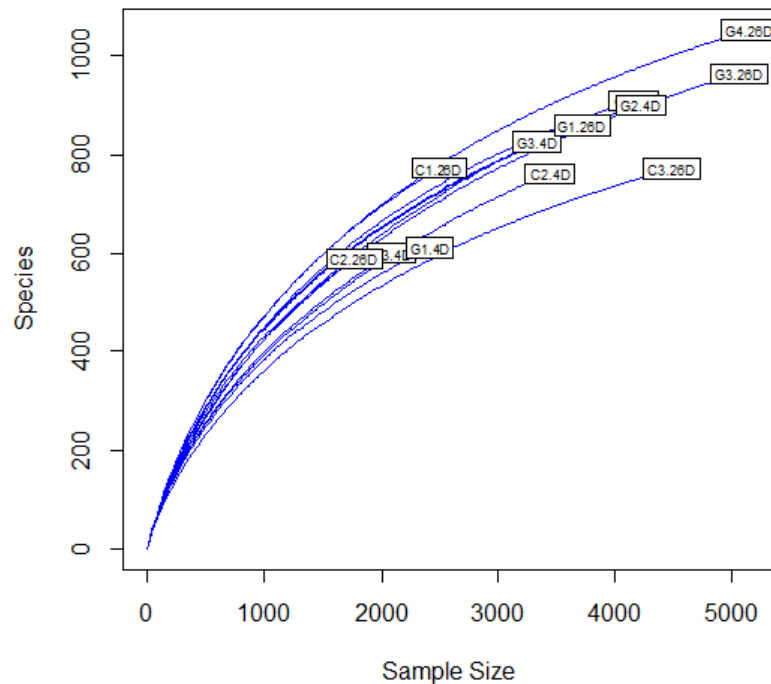


Figura 31. Curvas de rarefacción para las distintas muestras analizadas mediante *barcoded amplicon-sequencing*. Se indica el número de unidades operativas taxonómicas (OTUs) bacterianas (“*Species*”) esperables para un número creciente de secuencias en cada muestra (“*Sample size*” o esfuerzo de muestreo). La identidad de las muestras se indica en recuadros. La letra C indica el método de corte y la letra G el método con glifosato. El número luego de la letra indica la réplica, mientras que el número después del punto indica la fecha de muestreo (.4D: 4 días; .26D: 26 días).

5.2.1.1 Análisis de diversidad α

La riqueza de especies (S' e índice de Chao-1) resultó muy similar en todos los casos (Tablas 30 y 31) al igual que los dos índices de diversidad o heterogeneidad evaluados (Tabla 32) y que los índices de equitatividad (Tabla 33). Dado que se trabajó con datos rarefaccionados, es decir, bajo un mismo esfuerzo de muestreo para todas las muestras, se realizaron comparaciones estadísticas mediante un ANOVA de dos factores, tal como se indica en la Tabla 34. No se observó un efecto significativo del método de finalización ni de la fecha de muestreo como así tampoco de la interacción (Tabla 34).

Tabla 30. Número de OTUs observados para cada una de las muestras. C.4D=corte/4 días; G.4D= glifosato/4 días; C.26D=corte/26 días; G.26D=glifosato/26 días.

Número de OTUs observados (S')					
4 días					
C1.4D	C2.4D	C3.4D	G1.4D	G3.4D	G4.4D
632	536	557	523	602	602
26 días					
C1.26D	C2.26D	C3.26D	G1.26D	G3.26D	G4.26D
646	590	493	602	577	649

CAPÍTULO 4

Tabla 31. Índice de Chao-1. El valor entre paréntesis corresponde al error estándar de la media ($n=3$).

Índice de Chao-1		
	4 días	26 días
Glifosato	1005,71 (67,59)	1065,17 (53,37)
Corte	992,32 (28,30)	986,87 (60,39)

Tabla 32. Índices de heterogeneidad para cada tratamiento. Se indican los valores correspondientes al índice de Shannon-Weaver (H') y el recíproco del índice de Simpson ($1/\lambda$). El valor entre paréntesis corresponde al error estándar de la media ($n=3$).

	H'		$1/\lambda$	
	4 días	26 días	4 días	26 días
Glifosato	5,59 (0,072)	5,81 (0,08)	104,38 (24)	163,44 (18,82)
Corte	5,61 (0,10)	5,66 (0,19)	104,65 (2,59)	137,27 (32,87)

Tabla 33. Índices de equitatividad para cada tratamiento. Se indican los valores correspondientes al índice de equitatividad de Shannon (E_H) y el cociente de Hill ($R_{1:2}$). El valor entre paréntesis corresponde al error estándar de la media ($n=3$).

	E_H		$R_{1:2}$	
	4 días	26 días	4 días	26 días
Glifosato	0,88 (0,012)	0,91 (0,008)	2,77 (0,43)	2,08 (0,07)
Corte	0,88 (0,005)	0,89 (0,02)	2,62 (0,22)	2,25 (0,17)

Tabla 34. Análisis de la variancia (ANOVA) para los índices de diversidad alfa. Se indican los valores de probabilidad asociada para los efectos principales (M=método de finalización y S=fecha de muestreo) como así también para la interacción entre ambos factores (M×S). *gl*: grados de libertad. Chao-1: índice de Chao-1 (riqueza estimada); S' : riqueza observada (OTUs observados); $1/\lambda$: recíproco de Simpson; H' : índice de Shannon-Weaver; $R_{1:2}$: cociente de Hill; E_H : índice de equitatividad de Shannon. Valores de $P < 0,05$ indican significancia estadística.

ANOVA	Diversidad alfa					
	Chao-1	S'	$1/\lambda$	H'	$R_{1:2}$	E_H
M ($gl=1$)	$P=0,42$	$P=0,61$	$P=0,58$	$P=0,58$	$P=0,96$	$P=0,59$
S ($gl=1$)	$P=0,63$	$P=0,59$	$P=0,076$	$P=0,30$	$P=0,073$	$P=0,20$
M×S ($gl=1$)	$P=0,57$	$P=0,62$	$P=0,57$	$P=0,52$	$P=0,54$	$P=0,49$
<i>gl</i> error	8	8	8	8	8	8

5.2.1.2 Análisis de diversidad β

En la Figura 32 se observa el ordenamiento mediante NMDS del ranking de disimilitudes (Bray-Curtis) calculadas a partir de los valores de abundancia de los diferentes OTUs. El valor de estrés del análisis (menor a 0,1) indicó una representación adecuada en el espacio

bidimensional. Las muestras correspondientes a las dos fechas de muestreo analizadas muestran un cierto grado de separación en el ordenamiento (4D y 26D). En cambio, no se detecta una separación obvia de muestras correspondientes a los dos métodos de finalización, observándose un solapamiento de las elipses correspondientes al método de corte (negro) y al método con glifosato (rojo) (Figura 32). Si se comparan las muestras del método de corte y del método con glifosato a los 26 días, puede apreciarse que estas últimas (G.26D) muestran una mayor proximidad a las muestras de ambos métodos obtenidas a los 4 días (C.4D y G.4D). Esta última tendencia es importante de remarcar ya que también se observó en el ordenamiento de perfiles fisiológicos (Figura 25).

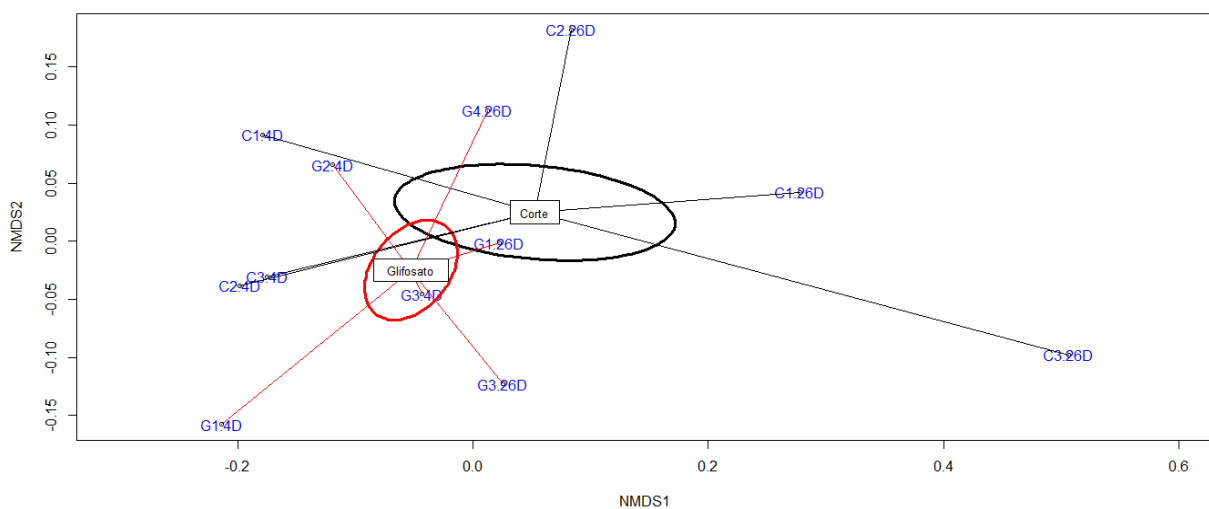


Figura 32. Análisis multivariado del conjunto de datos metagenómicos (abundancia de OTUs) mediante escalamiento multidimensional no métrico (NMDS). La letra C indica el método de corte y la letra G el método con glifosato. El número luego de las letra indica la réplica, mientras que el número después del punto indica la fecha de muestreo (.4D: 4 días; 26D: 26 días). Los centroides se encuentran indicados con recuadros. Las elipses corresponden al error estándar (rojo=glifosato; negro=corte). El análisis se llevó a cabo utilizando la medida de disimilitud Bray-Curtis. *Stress-value*=0,083.

En la Tabla 35 se muestran los resultados del NMDS, ajustado para los factores método de finalización y fecha de muestreo. Solamente se observó significancia estadística para el factor fecha de muestreo.

Tabla 35. Significancia de los factores estudiados en el escalamiento multidimensional no métrico (NMDS). Se indican los valores correspondientes a cada factor (999 permutaciones). Valores de $P < 0,05$ indican significancia estadística.

Bondad de ajuste		
Factor	R ²	P-value
Método de finalización	0,066	0,47
Fecha de muestreo	0,47	0,004

CAPÍTULO 4

El dendrograma de la Figura 33 muestra el resultado del análisis de conglomerados (agrupamiento jerárquico, UPGMA) obtenido a partir de la matriz de disimilitudes de Bray-Curtis, en la cual se basó también el análisis anterior (NMDS). En él se aprecia claramente una tendencia similar a la mencionada previamente en la Figura 32: las muestras correspondientes a las dos fechas de muestreo (4 y 26 días) forman grupos separados. Asimismo, a diferencia de lo observado para dos de las muestras del método de corte (C1.26D y C3.26D), las tres muestras del método con glifosato a los 26 días (G.26D) presentan mayor similitud con las muestras correspondientes a 4 días. Dentro de cada fecha de muestreo en particular, no se observa una separación clara entre métodos.

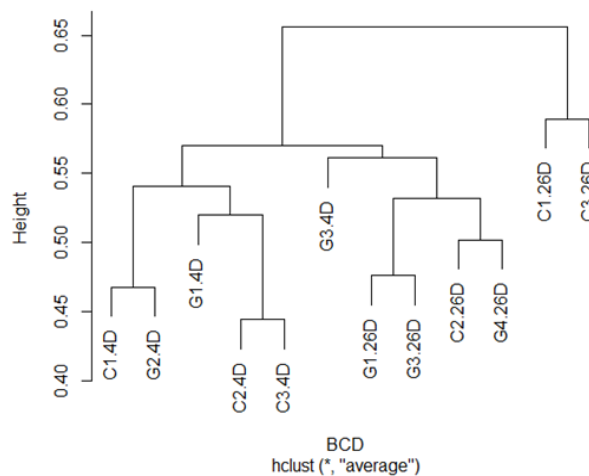


Figura 33. Análisis de agrupamientos del conjunto de datos metagenómicos (abundancia de OTUs). La letra C indica el método de corte y la letra G el método con glifosato. El número luego de la letra indica la réplica, mientras que el número después del punto indica la fecha de muestreo (.4D: 4 días; 26D: 26 días). El eje vertical indica la medida de disimilitud (Bray-Curtis). Se utilizó el algoritmo de agrupamiento jerárquico UPGMA.

El análisis del conjunto de total de datos mediante NPMANOVA (ADONIS) indicó un efecto estadísticamente significativo sólo de la fecha de muestreo, pero se tuvo en cuenta la interacción ($P=0,10$; Tabla 36), por lo tanto se realizaron comparaciones entre métodos dentro de cada fecha de muestreo (Tabla 37).

Tabla 36. Análisis multivariado de la variancia no paramétrico (NPMANOVA) para el conjunto total de datos metagenómicos (abundancia de OTUs). *gl*: grados de libertad. Valores de $P<0,05$ indican significancia estadística.

NPMANOVA (ADONIS)	
M (<i>gl</i>=1)	$P=0,24$ ($F=2,09$)
S (<i>gl</i>=1)	$P<0,001$ ($F=1,12$)
M×S (<i>gl</i>=1)	$P=0,10$ ($F=1,27$)
<i>gl</i> error	8

CAPÍTULO 4

El efecto del método de finalización no resultó significativo ni al inicio (4 días) ni al final del ensayo (26 días), tal como lo indicaron las comparaciones de a pares mediante ANOSIM (Tabla 37). Los valores del estadístico R, inferiores a 0,5 en ambas fechas, indican que no existe una separación clara entre las muestras del método de corte y con glifosato.

Tabla 37. Comparación de datos metagenómicos entre métodos de finalización dentro cada fecha de muestreo. Se utilizó el test multivariado de análisis de similitudes (ANOSIM, 999 permutaciones) para analizar las diferencias entre grupos.

Comparación	ANOSIM	
	<i>R-statistic</i>	Significancia
Corte vs Glifosato (4 días)	-0,07	0,8
Corte vs Glifosato (26 días)	0,3	0,1

5.2.1.3 Composición de la comunidad bacteriana de la rizosfera

En términos generales, no se observaron diferencias mayores en la distribución de valores de abundancia relativa a nivel de filo entre los métodos de finalización dentro de cada fecha de muestreo, ni tampoco entre fechas (Figura 34).

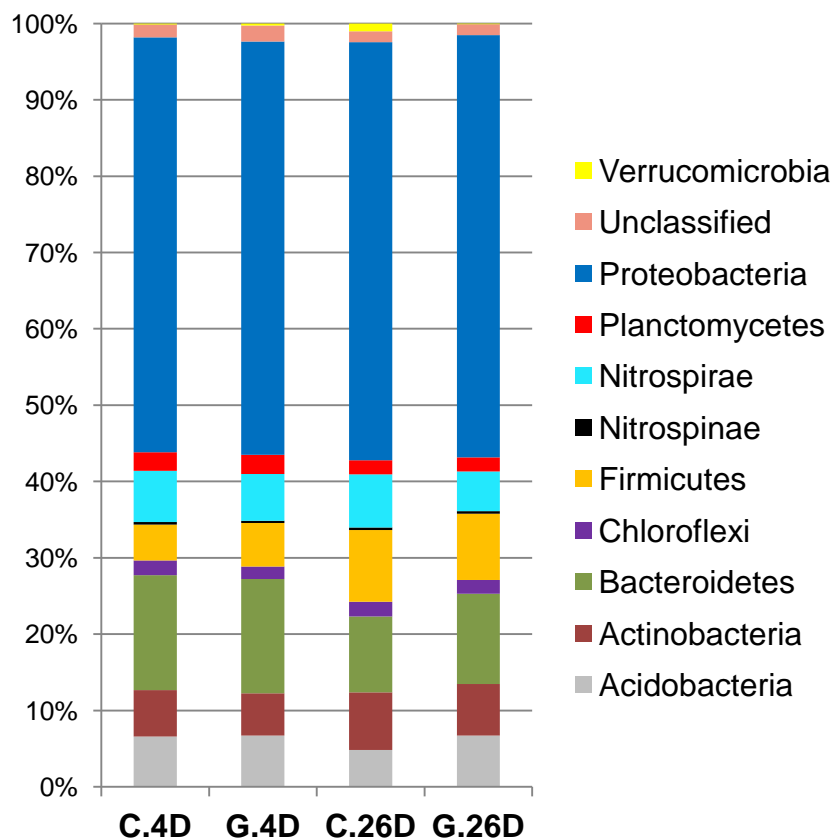


Figura 34. Representación gráfica de la abundancia relativa de los distintos fila bacterianos. Los valores indicados para cada tratamiento corresponden a la media de tres réplicas biológicas ($n=3$). **C.4D:** Corte/4 días; **G.4D:** Glifosato/4 días; **C.26D:** Corte/26 días; **G.26D:** Glifosato/ 26 días.

CAPÍTULO 4

Se observó una notable dominancia de *Proteobacteria* en relación a los demás filo, seguido de *Bacteroidetes*. La abundancia relativa promedio de cada filo para cada tratamiento se encuentra indicada en la Tabla 38. La abundancia de *Nitrospirae*, un filo normalmente poco abundante en la rizosfera, mostró una representatividad similar a la de *Actinobacteria* y *Acidobacteria* (Figura 34, Tabla 38).

Tabla 38. Abundancia relativa de los distintos filo bacterianos. Los valores indicados para cada tratamiento (%) corresponden a la media de tres réplicas ($n=3$). **C.4D:** Corte/4 días; **G.4D:** Glifosato/4 días; **C.26D:** Corte/26 días; **G.26D:** Glifosato/ 26 días.

Filo	C.4D	G.4D	C.26D	G.26D
Acidobacteria	6,61	6,70	4,83	6,70
Actinobacteria	5,93	5,38	7,38	6,47
Bacteroidetes	15,04	14,93	9,89	11,85
Chloroflexi	1,23	1,23	1,45	1,34
Firmicutes	4,68	5,61	9,27	8,61
Nitrospirae	0,30	0,25	0,30	0,28
Nitrospirae	6,72	6,13	6,81	5,19
Planctomycetes	2,28	2,38	1,76	1,81
Proteobacteria	53,98	53,78	54,06	54,95
Sin clasificar	3,10	3,34	3,25	2,68
Verrucomicrobia	0,13	0,28	1,00	0,11
Total	100,00	100,00	100,00	100,00

En la Figura 35 se observan los resultados comparativos a nivel de filo. Para ninguno de los filo bacterianos se observaron diferencias significativas ($P>0,05$) como así tampoco diferencias potencialmente relevantes a nivel biológico (es decir, con $DP>1,5\%$ o $RP>1,5$; Anexo IV, Tablas 58 y 59). Sin embargo, como se describirá a continuación, al analizar niveles taxonómicos inferiores se observan diferencias marginalmente significativas y que podrían ser importantes a nivel biológico. El significado de estos resultados en relación al tipo de estudio realizado se discutirá en la Sección 6.

La comparación entre fechas de muestreo dentro de cada método indicó que tanto para el método de corte como para el método con glifosato, la abundancia de *Firmicutes* se incrementa significativamente ($P<0,05$) (Anexo IV, Figura 55). Dado que el incremento se observa en ambos métodos, la diferencia entre métodos a los 26 días no resulta significativa (Figura 35). El resto de los filo no mostraron modificaciones significativas entre fechas (Anexo IV, Figura 55).

Como se observa en la Figura 36, el agrupamiento basado en la abundancia relativa de los distinta filo indica que no existe una separación clara entre ambos métodos de finalización a los 4 días ni a los 26 días, al igual que lo observado previamente en la Figura 33 para el análisis de agrupamiento basado en la abundancia relativa de los distintos OTUs.

CAPÍTULO 4

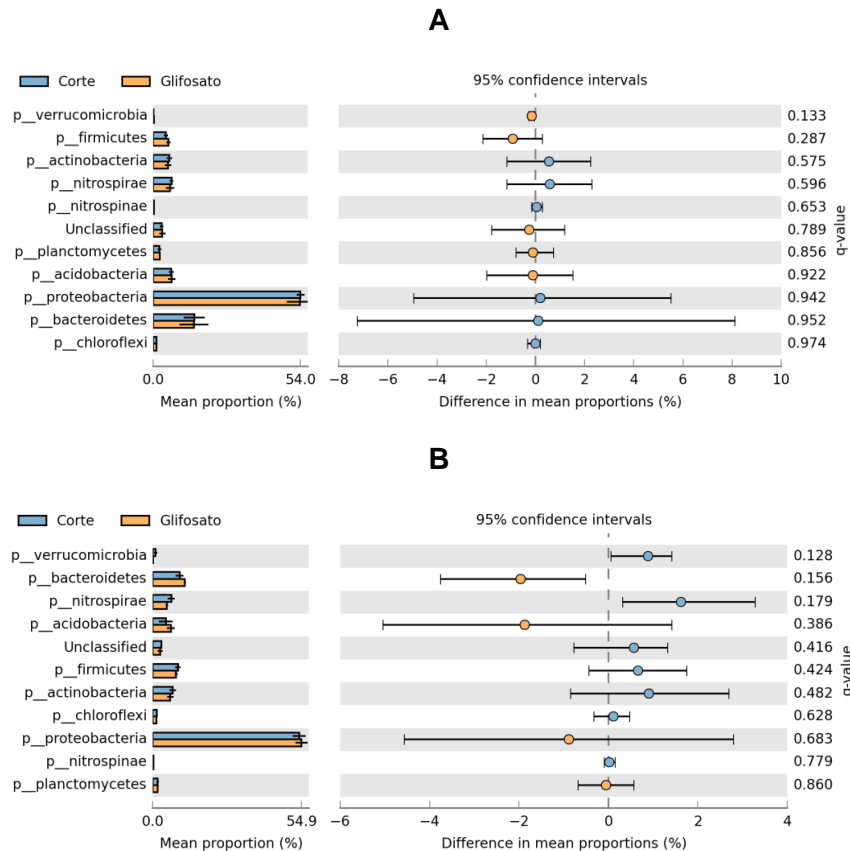


Figura 35. Análisis comparativo de los distintos fila bacterianos entre métodos de finalización a los 4 (A) y 26 días (B). El análisis se realizó mediante el software STAMP utilizando un test-t no paramétrico (*White's t-test*) a un nivel de significación del 5%. La categoría "Unclassified" corresponde a secuencias bacterianas sin asignación taxonómica. Los valores de probabilidad asociada se encuentran indicados como *q-value*. Se indican también los intervalos de confianza en cada comparación.

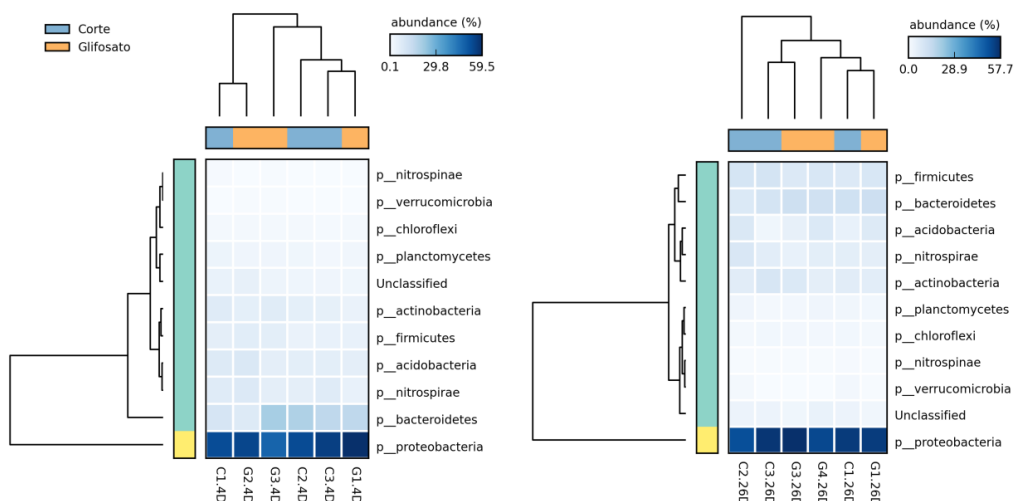


Figura 36. Agrupamientos de comunidades bacterianas considerando la abundancia relativas de los distintos fila. La abundancia relativa (%) se indica en gradiente de color. El análisis se realizó mediante el software STAMP utilizando el algoritmo de agrupamiento UPGMA. El panel de la izquierda corresponde a la fecha inicial de muestreo (4 días) mientras que el panel de la derecha corresponde a la fecha final (26 días).

CAPÍTULO 4

A nivel de clase, se observó una diferencia marginalmente significativa ($P=0,076$) y de posible relevancia biológica ($DP=5,66$; $RP=1,68$) en *Betaproteobacteria* a los 4 días (Figura 37A), no observable a los 26 días (Figura 37B). La mayor abundancia de este grupo microbiano en el método con glifosato podría guardar relación con diferencias en la estructura de la comunidad observadas mediante PCR-DGGE (véase Sección 5.2.3 y Sección 6). Por su parte, *Bacilli* mostró una abundancia relativa significativamente mayor en el método con glifosato a los 26 días ($P=0,041$), diferencia de posible relevancia biológica ($DP=-2,4$; $RP=1,55$) (Figura 37B), no observada a los 4 días (Figura 37A). Los valores de abundancia relativa y el tamaño del efecto (DP y RP) para cada método a los 4 y 26 días se detallan en las Tablas 60-61 y 62-63 del Anexo IV, respectivamente. Considerando la abundancia relativa promediada para ambos métodos, *Alphaproteobacteria* presentó la mayor abundancia a los 4 días (16,53%), seguido de *Gammaproteobacteria* (13,74%), *Flavobacteriia* (11,68%) y luego el resto de las clases del filo *Proteobacteria*: *Betaproteobacteria* (11,10%) y *Deltaproteobacteria* (9,93%) (Anexo IV, Tabla 60). En cambio, para 26 días *Gammaproteobacteria* mostró la mayor abundancia (14,99%), seguido de *Betaproteobacteria* y *Alphaproteobacteria* en proporciones similares (13,07% y 12,6%, respectivamente). La abundancia de *Flavobacteriia* se ubicó por debajo de las clases de *Proteobacteria* (8,94%), excepto de *Deltaproteobacteria* (8,10%) (Anexo IV, Tabla 62). El porcentaje de secuencias sin asignación (*Unclassified*) fue similar en ambas fechas y de magnitud mayor a las clases de mayor representatividad mencionadas anteriormente (23,17% y 23,79% para 4 y 26 días, respectivamente). Al comparar entre fechas dentro de cada método, se observó una disminución en la abundancia de *Alphaproteobacteria* únicamente en el método de finalización de corte (Anexo IV, Figura 56A). En cambio, para *Bacilli* la abundancia se incrementó significativamente ($P<0,05$) a los 26 días respecto de 4 días, sólo en el método con glifosato (Anexo IV, Figura 56B).

En forma consistente con la diferencia significativa observada para *Bacilli* a los 26 días (Figura 37B), al analizar un nivel taxonómico inferior se detectó un incremento marginalmente significativo en el orden *Bacillales* ($P=0,061$, Figura 38B), el más importante dentro de *Bacilli*. La relevancia biológica de esta mayor abundancia en el método con glifosato se discutirá en la Sección 6. En tal sección también se hará referencia a la mayor abundancia de *Burkholderiales* en el método con glifosato, observada sólo a los 4 días (Figura 38A). Si bien esta diferencia ($DP=-3,34$; $RP=2,11$) no es estadísticamente significativa ($P>0,05$), podría tener importancia biológica según estudios previos. Los valores de abundancia relativa y el tamaño del efecto (DP y RP) para cada método a los 4 y 26 días se detallan en las Tablas 64-65 y 66-67 del Anexo IV, respectivamente.

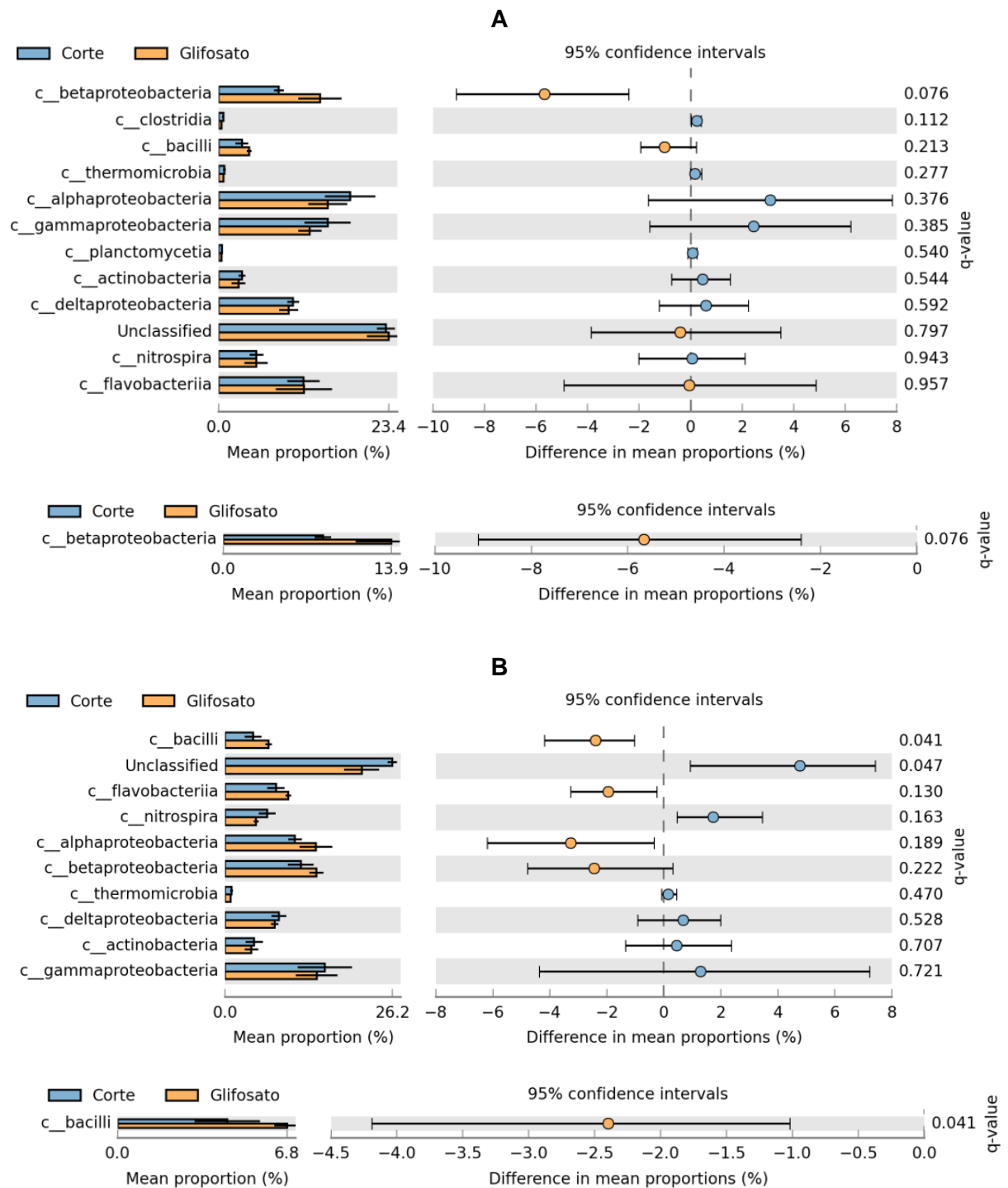


Figura 37. Análisis comparativo de las distintas clases bacterianas entre métodos de finalización a los 4 días (A) y 26 días (B). El análisis se realizó mediante el software STAMP utilizando un test-t no paramétrico (*White's t-test*) a un nivel de significación del 5%. Sólo se consideraron las categorías con un mínimo de cinco secuencias. En cada caso, el panel superior corresponde a los resultados sin filtro de tamaño del efecto y el inferior a aquellos con filtro, de posible relevancia biológica ($DP > 1,5\%$; $RP > 1,5$). La categoría "Unclassified" corresponde a secuencias bacterianas sin asignación taxonómica. Los valores de probabilidad asociada se encuentran indicados como *q-value*. Se indican también los intervalos de confianza en cada comparación.

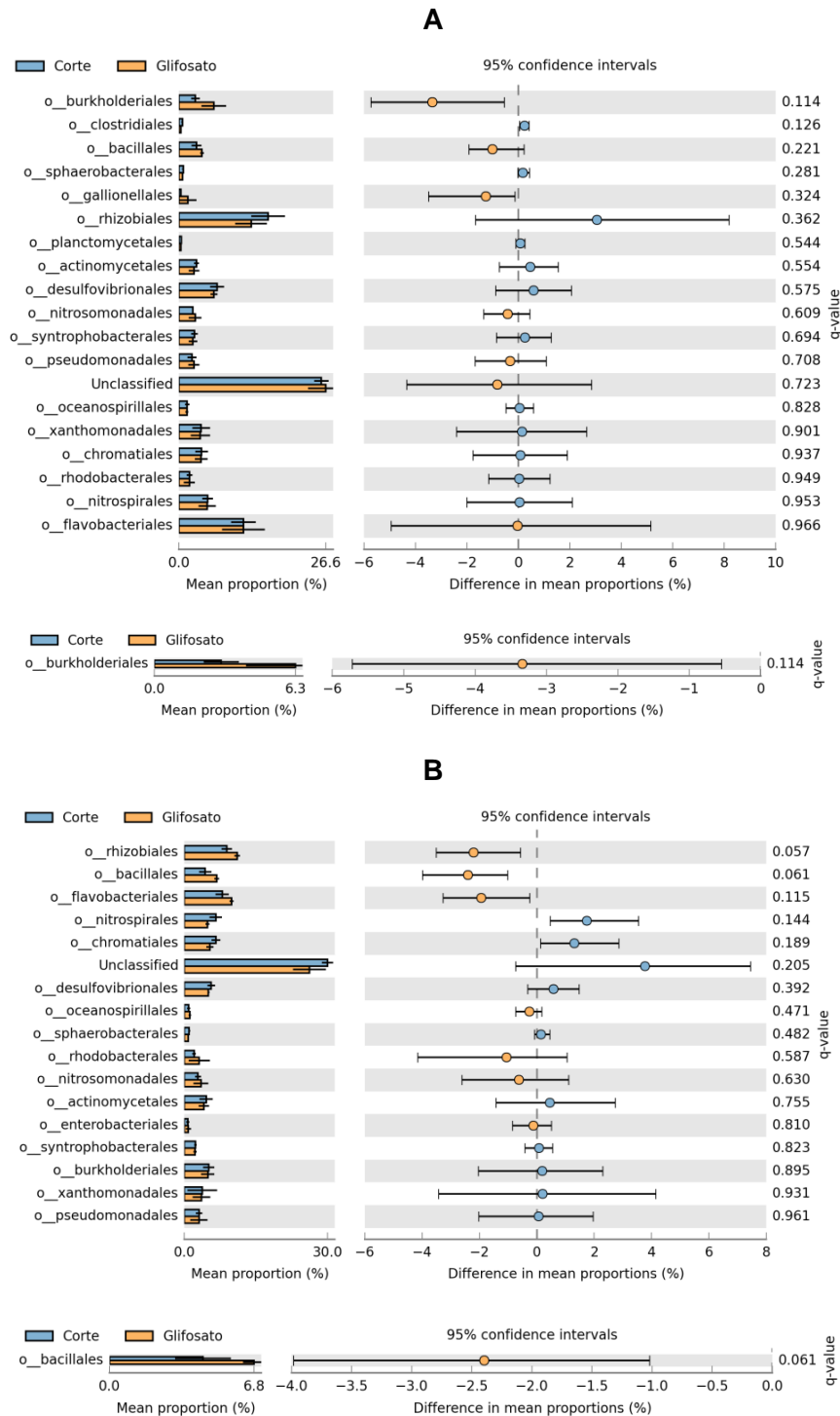


Figura 38. Análisis comparativo de los distintos órdenes bacterianos entre métodos de finalización a los 4 días (A) y 26 días (B). El análisis se realizó mediante el software STAMP utilizando un test-t no paramétrico (*White's t-test*) a un nivel de significación del 5%. Sólo se consideraron las categorías con un mínimo de cinco secuencias. En cada caso, el panel superior corresponde a los resultados sin filtro de tamaño de efecto y el inferior a aquellos con filtro, de posible relevancia biológica ($DP > 1,5\%$; $RP > 1,5$). La categoría "Unclassified" corresponde a secuencias bacterianas sin asignación taxonómica. Los valores de probabilidad asociada se encuentran indicados como *q-value*. Se indican también los intervalos de confianza en cada comparación.

CAPÍTULO 4

El orden que mostró la mayor abundancia a los 4 días fue *Rhizobiales* (14,61%), seguido de *Flavobacteriales* (11,68%), *Desulfovibrionales* (6,63%), *Nitrospirales* (5,18%) y *Burkholderiales* (4,67%) (Anexo IV, Tabla 64). A los 26 días, *Rhizobiales* y *Flavobacteriales* continuaron mostrando la mayor abundancia (9,99 y 8,94%, respectivamente), seguido de *Chromatiales* (6,01%), *Nitrospirales* (5,74%) y *Bacillales* (5,6%) (Anexo IV, Tabla 66). La comparación entre fechas dentro de cada método indicó una disminución significativa de *Rhizobiales* ($P<0,05$) en el método de corte hacia los 26 días post-tratamiento (Anexo IV, Figura 57A) y un incremento de *Bacillales* en el método de con glifosato ($P<0,05$; Anexo IV, Figura 57B).

El análisis a nivel de familia indicó una mayor abundancia de la familia *Comamonadaceae* a los 4 días (Figura 39) en el método con glifosato ($DP=-1,85$; $RP=2,44$). Si bien la diferencia no fue significativa ($P=0,11$), sigue la misma tendencia que resultados anteriores: la familia *Comamonadaceae* pertenece al orden *Burkholderiales*, el cual mostró también una diferencia (en la misma fecha de muestreo) que podría ser biológicamente relevante según el tamaño del efecto y según investigaciones relacionadas, tal como se mencionó anteriormente. El resto de las familias no mostraron diferencias significativas o un tamaño del efecto mayor al mínimo establecido. Los valores de abundancia relativa y el tamaño del efecto (DP y RP) para cada método a los 4 y 26 días se detallan en las Tablas 68-69 y 70-71 del Anexo IV, respectivamente. Si bien la familia *Brucellaceae* presentó una diferencia significativa ($P<0,05$) a los 4 días, la diferencia no superó el filtro de tamaño del efecto. Lo mismo ocurrió con la familia *Bradyrhizobiaceae*, a los 26 días. En esta última fecha de muestreo, sólo se observaron diferencias que podrían ser biológicamente relevantes para *Bacillaceae* ($DP=-1,57$; $RP=2,73$) y *Rhodobacteraceae* ($DP=-1,72$; $RP=3,07$) (Figura 39). La familia *Bacillaceae* corresponde al orden *Bacillales*, el cual mostró también una tendencia similar a los 26 días, con una abundancia mayor en el método con glifosato, tal como se indicó anteriormente (Figura 38). Un alto porcentaje de secuencias (alrededor de un 73%) no pudieron ser asignadas a ninguna familia.

La comparación entre fechas dentro de cada método indicó un incremento marginalmente significativo en la abundancia de *Comamonadaceae* en el método de corte ($P=0,079$; Anexo: Figura 58) desde 4 días a 26 días, mientras que la abundancia de la familia *Brucellaceae* se redujo significativamente entre ambas fechas en el método de corte ($P=0,020$) pero no con glifosato.

Al realizar el análisis comparativo entre ambos métodos para los diferentes OTUs, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas a los 4 días (Figura 40A) pero sí a los 26 días (Figura 40B). No obstante, algunas de las diferencias observadas a los 4 días

CAPÍTULO 4

podrían ser biológicamente relevantes, tal como se observó para el OTU 1 ($RP=4,34$), OTU 27 ($RP=2,05$) y OTU 15 ($RP=3,08$), y como se discutirá más adelante en la Sección 6.

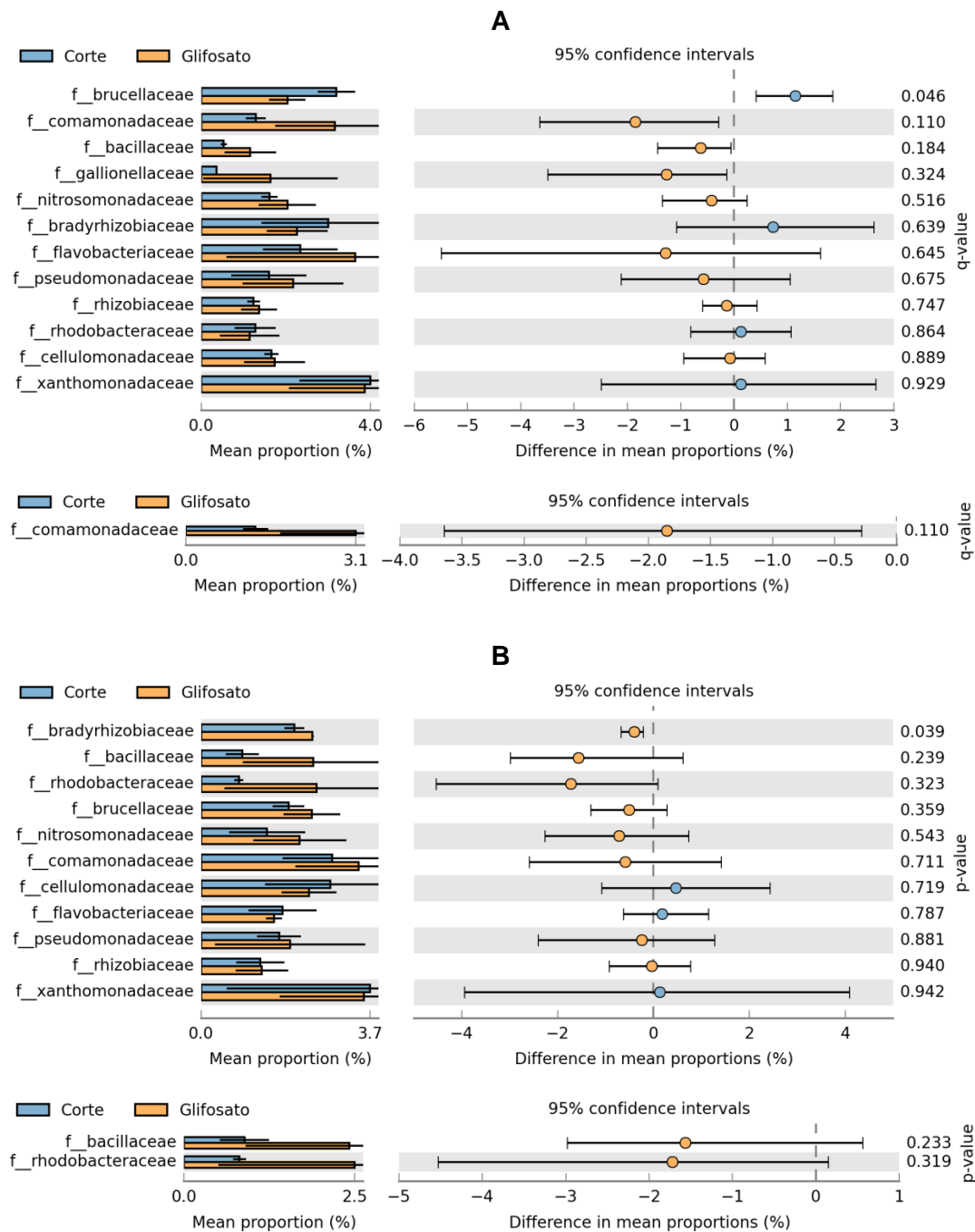


Figura 39. Análisis comparativo de las distintas familias bacterianas entre métodos de finalización a los 4 días (A) y 26 días (B). El análisis se realizó mediante el software STAMP utilizando un test-t no paramétrico (*White's t-test*) a un nivel de significación del 5%. Sólo se consideraron las categorías con un mínimo de cinco secuencias. En cada caso, el panel superior corresponde a los resultados sin filtro de tamaño de efecto y el inferior a aquellos con filtro, de posible relevancia biológica ($DP>1,5\%$; $RP>1,5$). La categoría "Unclassified", no se muestra para mejorar la visualización de las demás categorías. Se indican también los intervalos de confianza en cada comparación.

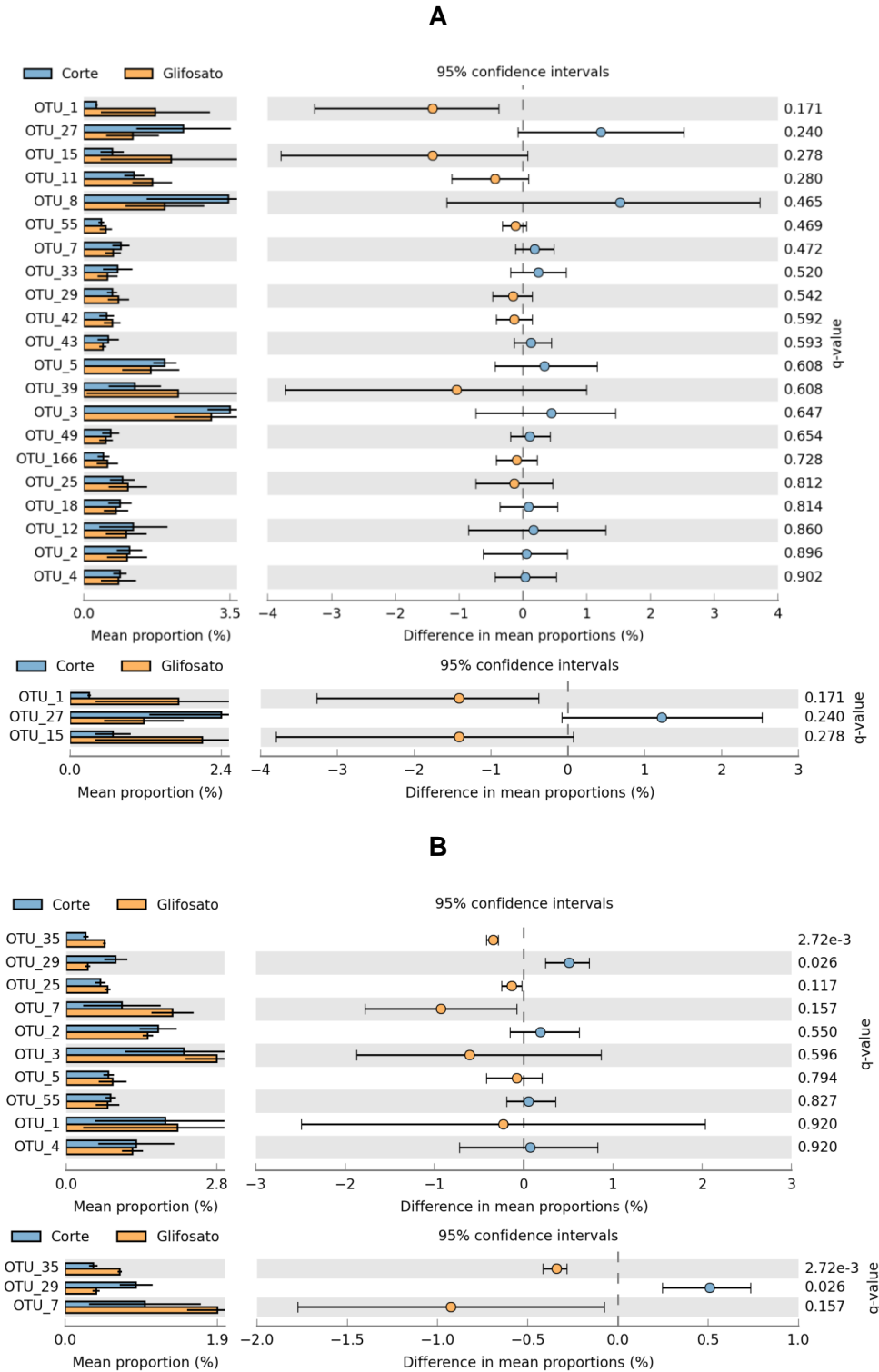


Figura 40. Análisis comparativo de los distintos OTUs bacterianos entre métodos de finalización a los 4 días (A) y 26 días (B). El análisis se realizó mediante el software STAMP utilizando un test-t no paramétrico (*White's t-test*) a un nivel de significación del 5%. Sólo se consideraron las categorías con un mínimo de cinco secuencias. En cada caso, el panel superior corresponde a los resultados sin filtro de tamaño de efecto y el inferior a aquellos con filtro, de posible relevancia biológica ($RP > 1,9$). Se indican también los intervalos de confianza en cada comparación.

CAPÍTULO 4

A los 26 días, el OTU 35 mostró una mayor abundancia ($P<0,05$; $RP=1,95$) en el método con glifosato al igual que el OTU 7, aunque para este último no se observó significancia estadística (Figura 40B). La diferencia observada entre ambos métodos para el OTU 29 también fue significativa ($P<0,05$) observándose una mayor abundancia en el método de corte ($RP=2,29$) (Figura 40B). Únicamente pudieron identificarse a nivel de género mediante BLASTn en Greengenes los siguientes OTUs: OTU 35 (Tabla 39), OTU 1 (Tabla 40) y OTU 15 (Tabla 41). De los tres restantes, dos no pudieron ser identificados (OTU 27 y OTU 7) mientras que el tercero (OTU 29) corresponde al filo *Verrucomicrobia*.

El OTU 35 corresponde a una especie del género *Mesorhizobium* (99% de identidad), según indicó la búsqueda con BLASTn en la base de datos Greengenes (Tabla 39). El género *Mesorhizobium* pertenece al orden *Rhizobiales* dentro de *Alphaproteobacteria*. Como se indicó anteriormente, este orden bacteriano también presentó una mayor abundancia relativa en el método con glifosato a los 26 días, aunque la diferencia en dicho caso fue marginalmente significativa y el tamaño del efecto no superó el valor de corte (Figura 38B).

Tabla 39. Resultado del alineamiento (BLASTn) para el OTU 35 en la base de datos Greengenes. Se indican las secuencias (*hits*) que produjeron los cinco alineamientos más significativos.

<i>Hit</i>	Número de acceso (Greengenes)	Número de acceso (GenBank)	Score (bits)	<i>E-value</i>	Identidad (%)
<i>Mesorhizobium</i> sp. str. RP1	330608	EU999231.1	420	e-116	99,26
<i>Mesorhizobium loti</i> str. NGTS14	795096	AB289614.1	416	e-115	99,26
<i>Mesorhizobium amorphae</i> str. CCNWYC116	782763	EU849579.1	416	e-116	99,26
<i>Mesorhizobium</i> sp. str. LVC3	775781	FNS63443.1	416	e-117	99,26
<i>Mesorhizobium</i> sp. str. DC2b-3	769132	AB552863.1	416	e-118	99,26

En el caso del OTU 1, la búsqueda indicó un 99% de identidad con especies del género *Hydrogenophaga* (Tabla 40). Este género pertenece a la familia *Comamonadaceae* y al orden *Burkholderiales*, los cuales mostraron también una mayor abundancia en el método con glifosato en la misma fecha de muestreo (4 días) (Figuras 38A y 39A). A diferencia del OTU 35, para el OTU 1 no se observó significancia estadística pero el resultado podría ser relevante a nivel biológico, tal como se discutirá en la Sección 6.

CAPÍTULO 4

Tabla 40. Resultado del alineamiento (BLASTn) para el OTU 1 en la base de datos Greengenes. Se indican las secuencias (*hits*) que produjeron los cinco alineamientos más significativos.

<i>Hit</i>	Número de acceso (Greengenes)	Número de acceso (GenBank)	Score (bits)	<i>E-value</i>	Identidad (%)
<i>Hydrogenophaga palleroni</i> str. CCUG 20334	683257	NR_024936.1	424	e-118	99,62
<i>Hydrogenophaga pseudoflava</i> str. Xb1	611508	FJ947058.1	424	e-118	99,62
<i>Hydrogenophaga</i> sp. str. DD8b	630203	HQ113382.1	424	e-118	99,62
<i>Hydrogenophaga pseudoflava</i> str. GA3 ATCC 33668	590859	NR_028717	416	e-118	99,62
<i>Hydrogenophaga</i> sp. str. XJ-L58	347693	EU817490.1	416	e-118	99,62

Para el OTU 15 (Tabla 41), se obtuvo un 99% de identidad con *Acidovorax delafieldii*, una especie perteneciente también a la familia *Comamonadaceae* y al orden *Burkholderiales*.

Tabla 41. Resultado del alineamiento (BLASTn) para el OTU 15 en la base de datos Greengenes. Se indican las secuencias (*hits*) que produjeron los cinco alineamientos más significativos.

<i>Hit</i>	Número de acceso (Greengenes)	Número de acceso (GenBank)	Score (bits)	<i>E-value</i>	Identidad (%)
<i>Acidovorax</i> sp. str. KNA	777675	AB539974.1	424	e-118	99,26
<i>Acidovorax delafieldii</i> str. THWCSN52	589846	GQ284424.1	424	e-118	99,26
<i>Acidovorax delafieldii</i> str. THWCSN5	589089	GQ284431.1	424	e-118	99,26
<i>Acidovorax delafieldii</i> str. TSWCSN28	588724	GQ284418.1	424	e-118	99,26
<i>Acidovorax delafieldii</i> str. PCWCS26	586985	GQ284435.1	424	e-118	99,26

5.2.2 Abundancia de BOA, AOA, Actinobacteria y bacterias totales

Los efectos del método de finalización sobre la abundancia de los diferentes grupos microbianos fueron evaluados mediante qPCR de los genes indicadores correspondientes. La eficiencia de la qPCR fue de 82% para el gen *amoA*_{BOA}; 79,46% para el gen *amoA*_{AOA}; 96,29% para el amplicón correspondiente al gen del ARNr 16S_{Actinobacteria} y 86,96% para el gen del ARNr 16S de *Eubacteria*. Las ecuaciones obtenidas del ajuste lineal de las curvas estándar, que describen la relación entre los valores de *Ct* y el número de copias de cada gen indicador, fueron las siguientes:

CAPÍTULO 4

$Ct = 36,74 - 3,85 \log_{10} (n^{\circ} \text{ copias})$ para el gen $amoA_{BOA}$ ($R^2=0,99$);

$Ct = 38,63 - 3,94 \log_{10} (n^{\circ} \text{ copias})$ para el gen $amoA_{AOA}$ ($R^2=0,99$);

$Ct = 38,02 - 3,41 \log_{10} (n^{\circ} \text{ copias})$ para el gen del ARNr 16S_{Actinobacteria} ($R^2=0,99$);

$Ct = 41,84 - 3,68 \log_{10} (n^{\circ} \text{ copias})$ para el gen del ARNr 16S de *Eubacteria* ($R^2 = 0,99$);

En la Tabla 42 se indican los resultados del análisis estadístico para los diferentes grupos microbianos al comparar el número de copias de los genes indicadores utilizados en cada caso.

Tabla 42. Análisis de la variancia (ANOVA) para el número de copias de genes indicadores de cada grupo microbiano. Se indican los valores de probabilidad asociada para los efectos principales (M=método de finalización y S=fecha de muestreo) como así también para la interacción entre ambos factores (M×S). *gl*: grados de libertad. Valores de $P<0,05$ indican significancia estadística.

ANOVA	BOA	AOA	<i>Actinobacteria</i>	Bacterias totales
M (<i>gl</i>=1)	$P=0,0052$	$P=0,16$	$P=0,52$	$P=0,11$
S (<i>gl</i>=3)	$P=0,56$	$P=0,069$	$P<0,001$	$P<0,0001$
M×S (<i>gl</i>=3)	$P=0,78$	$P=0,14$	$P=0,69$	$P=0,65$
<i>gl</i> error	24	24	24	24

El ANOVA de los datos correspondientes a BOA (\log_{10} copias $amoA \mu g^{-1}$ de ADN) indicó una interacción no significativa ($P=0,78$) entre los dos factores involucrados: método de finalización (M) y fecha de muestreo (S). En base a ello, se consideraron los efectos principales de ambos factores. Sólo resultó significativo el efecto correspondiente al método de finalización (Tabla 42) ($P<0,05$). En este caso, el número de copias del gen $amoA_{BOA}$ fue 1,68 veces mayor en la rizosfera de plantas sometidas al método de corte respecto del método con glifosato (Tabla 43). El número de copias del gen $amoA_{BOA}$ y del resto de los genes indicadores, promediando ambos métodos en cada fecha de muestreo, se indican en la Tabla 44.

Tabla 43. Número de copias de genes indicadores para cada grupo microbiano en los dos métodos de finalización (corte vs glifosato). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de ambos métodos de finalización. Los valores entre paréntesis corresponden al error estándar de la media ($n=16$). Se muestran sólo los grupos microbianos en los que se observó ausencia de interacción entre los factores estudiados.

Número de copias del gen indicador μg^{-1} ADN			
	BOA	<i>Actinobacteria</i>	Bacterias totales
Corte	$1,61.10^5 (1,66.10^4)^b$	$2,85.10^7 (3,26.10^6)^a$	$2,38.10^9 (2,16.10^8)^a$
Glifosato	$9,56.10^4 (1,85.10^4)^a$	$2,97.10^7 (2,66.10^6)^a$	$2,89.10^9 (2,95.10^8)^a$

CAPÍTULO 4

Tabla 44. Número de copias de los genes indicadores para cada grupo microbiano en las distintas fechas de muestreo (4, 10, 17 y 26 días). Letras diferentes indican diferencias significativas entre fechas. Los valores entre paréntesis corresponden al error estándar de la media ($n=8$). Se muestran sólo los grupos microbianos en los que se observó ausencia de interacción entre los factores estudiados.

Número de copias del gen indicador μg^{-1} ADN			
	BOA	<i>Actinobacteria</i>	Bacterias totales
4 días	$1,17 \cdot 10^5$ ($2,3 \cdot 10^4$) ^a	$2,75 \cdot 10^7$ ($2,32 \cdot 10^6$) ^a	$3,83 \cdot 10^9$ ($3,05 \cdot 10^8$) ^b
10 días	$1,66 \cdot 10^5$ ($3,31 \cdot 10^4$) ^a	$2,03 \cdot 10^7$ ($1,3 \cdot 10^6$) ^a	$3,03 \cdot 10^9$ ($1,09 \cdot 10^8$) ^b
17 días	$1,21 \cdot 10^5$ ($3,06 \cdot 10^4$) ^a	$2,67 \cdot 10^7$ ($3,57 \cdot 10^6$) ^a	$2,05 \cdot 10^9$ ($1,99 \cdot 10^8$) ^a
26 días	$1,09 \cdot 10^5$ ($2,02 \cdot 10^4$) ^a	$4,19 \cdot 10^7$ ($4,55 \cdot 10^6$) ^b	$1,62 \cdot 10^9$ ($2,04 \cdot 10^8$) ^a

Para AOA, se consideró la interacción entre ambos factores ($P=0,14$; Tabla 42). En base a ello, se realizaron comparaciones entre los dos métodos dentro de cada fecha de muestreo mediante pruebas-t, tal como se indica en la Tabla 45. Sólo se observó una diferencia significativa ($P<0,05$) en la última fecha: el número de copias en el método de corte fue 2,4 veces mayor respecto del método con glifosato. Las comparaciones múltiples (Tukey) entre las diferentes fechas de muestreo dentro del mismo método de finalización indicaron que, tanto para el método con glifosato como para el método de corte, la abundancia no difiere significativamente a lo largo de las cuatro fechas de muestreo ($P>0,05$; Figura 41).

Tabla 45. Comparación de métodos de finalización dentro de cada fecha de muestreo. Se indican las medias correspondientes a cada método como así también los valores de probabilidad asociada para cada comparación. Los números entre paréntesis indican el error estándar de la media ($n=4$). Los valores de probabilidad asociada corresponden a la comparación mediante el test-t para muestras independientes. Valores de $P<0,05$ indican diferencias estadísticamente significativas entre métodos de finalización.

Número de copias del gen <i>amoA</i> _{AOA} (copias <i>amoA</i> μg^{-1} ADN)				
	4 días	10 días	17 días	26 días
Corte	$2,04 \cdot 10^6$ ($3,82 \cdot 10^4$)	$3,95 \cdot 10^6$ ($7,71 \cdot 10^5$)	$5,87 \cdot 10^6$ ($1,96 \cdot 10^6$)	$3,57 \cdot 10^6$ ($8,69 \cdot 10^5$)
Glifosato	$3,51 \cdot 10^6$ ($9,49 \cdot 10^5$)	$2,65 \cdot 10^6$ ($6,9 \cdot 10^5$)	$4,34 \cdot 10^6$ ($8 \cdot 10^5$)	$1,49 \cdot 10^6$ ($3,42 \cdot 10^5$)
P-value	$P=0,29$	$P=0,31$	$P=0,74$	$P=0,037$

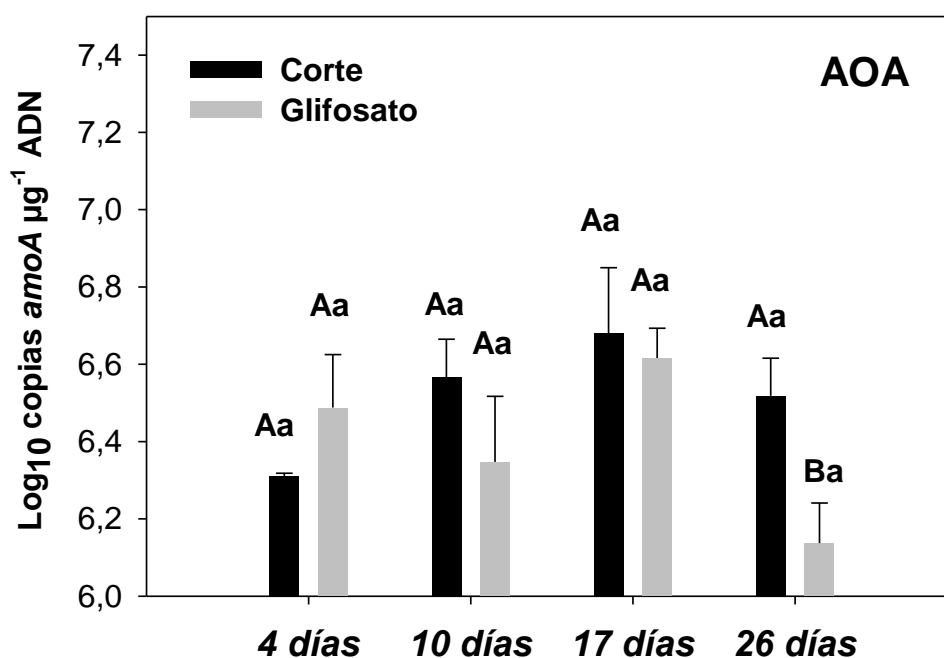


Figura 41. Número de copias (\log_{10}) del gen *amoA* de arqueas oxidantes del amoníaco (AOA) para ambos métodos de finalización en las cuatro fechas de muestreo. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los dos métodos de finalización dentro de cada fecha de muestreo ($P < 0,05$, test-t para muestras independientes). Letras minúsculas diferentes indican diferencias entre fechas de muestreo dentro de un mismo método de finalización ($P < 0,05$; Test de Tukey HSD).

Al realizar el análisis para bacterias totales y *Actinobacteria*, se observaron resultados diferentes a los obtenidos para AOA. En el primer caso, no se detectó interacción significativa ($P > 0,05$, Tabla 42), evaluándose entonces los efectos principales. El efecto principal del método de finalización no resultó significativo ($P > 0,05$, Tablas 42 y 43) pero sí lo fue el efecto correspondiente a la fecha de muestreo ($P < 0,0001$, Tablas 42 y 44). El número de copias (promediado para los dos niveles del factor método) a los 17 y 26 días se redujo significativamente en relación a la fecha inicial (1,9 y 3,4 veces, respectivamente, Tabla 44).

Para *Actinobacteria*, se obtuvieron resultados similares a bacterias totales: el efecto principal del método de finalización no resultó significativo ($P > 0,05$, Tablas 42 y 43) mientras que sí lo fue el efecto correspondiente a la fecha de muestreo ($P < 0,001$, Tablas 42 y 44). El número de copias (promediado para los dos niveles del factor método) se incrementó significativamente en relación a la fecha inicial sólo a los 26 días post-tratamiento (Tabla 44).

Para AOB y *Actinobacteria* se analizaron también los valores de abundancia relativa (AR), es decir, el número de copias de cada gen relativo al número de copias del gen que codifica para el ARNr 16S de *Eubacteria*. Los resultados del ANOVA de dos factores para los valores de abundancia relativa se indican a continuación en la Tabla 46.

CAPÍTULO 4

Tabla 46. Análisis de la variancia (ANOVA) para la abundancia relativa (AR) de distintos grupos microbianos. Se indican los valores de probabilidad asociada para los efectos principales (M y S) como así también para la interacción entre ambos factores (MxS). *gl*: grados de libertad. Valores de $P < 0,05$ indican significancia estadística.

ANOVA	AR _(BOA)	AR _(Actinobacteria)	AOA:BOA
M (<i>gl</i>=1)	$P=0,0008$	$P=0,38$	$P=0,17$
S (<i>gl</i>=3)	$P=0,072$	$P<0,0001$	$P=0,25$
MxS (<i>gl</i>=24)	$P=0,59$	$P=0,58$	$P=0,47$
<i>gl error</i>	24	24	24

Los resultados para AR de BOA y de *Actinobacteria* fueron similares a los obtenidos con la abundancia absoluta: en el primer caso sólo fue significativo el efecto del método de finalización ($P < 0,05$; Tablas 46 y 47) mientras que en el segundo caso sólo fue significativo el efecto de la fecha de muestreo ($P < 0,05$; Tablas 46 y 48).

Tabla 47. Abundancia relativa (AR) de genes indicadores para cada método de finalización. Los valores corresponden a la relación entre el número de copia del gen indicador de cada grupo (BOA, *Actinobacteria*) y el gen del ARNr 16S de *Eubacteria*. También se indica la relación entre el gen *amoA*_{AOA} y el gen *amoA*_{BOA} (AOA:BOA). Letras diferentes indican diferencias significativas entre métodos ($P < 0,05$). Los valores entre paréntesis corresponden al error estándar de la media ($n=16$).

Abundancia relativa de genes indicadores			
Método de finalización	AR _(BOA)	AR _(Actinobacteria)	AOA:BOA
Glifosato	$3,61 \cdot 10^{-5}$ ($6,28 \cdot 10^{-6}$) ^a	$1,34 \cdot 10^{-2}$ ($2,64 \cdot 10^{-3}$) ^a	50,89 (11,19) ^a
Corte	$7,54 \cdot 10^{-5}$ ($9,23 \cdot 10^{-6}$) ^b	$1,46 \cdot 10^{-2}$ ($2,52 \cdot 10^{-3}$) ^a	28,12 (5,05) ^a

Tabla 48. Abundancia relativa (AR) de genes indicadores para cada fecha de muestreo. Los valores corresponden a la relación entre el número de copia del gen indicador de cada grupo (BOA, *Actinobacteria*) y el gen del ARNr 16S de *Eubacteria*. También se indica la relación entre el gen *amoA*_{AOA} y el gen *amoA*_{BOA} (AOA:BOA). Letras diferentes indican diferencias significativas entre fechas ($P < 0,05$). Los valores entre paréntesis corresponden al error estándar de la media ($n=8$).

Abundancia relativa de genes indicadores			
Fecha de muestreo	AR _(BOA)	AR _(Actinobacteria)	AOA:BOA
4 días	$3,25 \cdot 10^{-5}$ ($6,80 \cdot 10^{-6}$) ^a	$7,37 \cdot 10^{-3}$ ($7,32 \cdot 10^{-4}$) ^a	37,68 (16,05) ^a
10 días	$5,61 \cdot 10^{-5}$ ($1,19 \cdot 10^{-5}$) ^a	$6,73 \cdot 10^{-3}$ ($4,14 \cdot 10^{-4}$) ^a	29,60 (7,30) ^a
17 días	$6,58 \cdot 10^{-5}$ ($1,86 \cdot 10^{-5}$) ^a	$1,41 \cdot 10^{-2}$ ($2,21 \cdot 10^{-3}$) ^b	65 (15,68) ^a
26 días	$6,85 \cdot 10^{-5}$ ($1,03 \cdot 10^{-5}$) ^a	$2,78 \cdot 10^{-2}$ ($3,24 \cdot 10^{-3}$) ^c	25,75 (5,39) ^a

La AR_{BOA} resultó 2,1 veces mayor en el método de corte respecto del método con glifosato (Tabla 47). Por su parte, la $AR_{Actinobacteria}$ se incrementó 3,8 veces al comparar la fecha inicial y final (Tabla 48). En cuanto a la abundancia de AOA relativa a BOA, no se observó un efecto significativo para ninguno de los dos factores analizados ($P > 0,05$; Tabla 46). Tal como lo indica la magnitud de este cociente, las AOA se encuentran presentes en mayor abundancia en la rizosfera que las BOA, para ambos métodos de finalización (Tabla 47) y para todas las fechas de muestreo (Tabla 48).

5.2.3 Estructura de la comunidad (*betaproteobacteria*) mediante PCR-DGGE

En la Figura 42 se observan los perfiles correspondientes a cada una de las muestras analizadas. Para algunos casos en particular, sólo pudieron amplificarse en la PCR inicial dos o tres de las cuatro réplicas del tratamiento. Si bien se probaron diluciones de las muestras para evitar la inhibición, no fue posible amplificarlas. La siembra de un volumen mayor del producto de PCR (12 μ l) en el gel, sugerida en estos casos, tampoco fue suficiente para visualizar perfiles de estas muestras (calles 1, 2, 13 y 17).

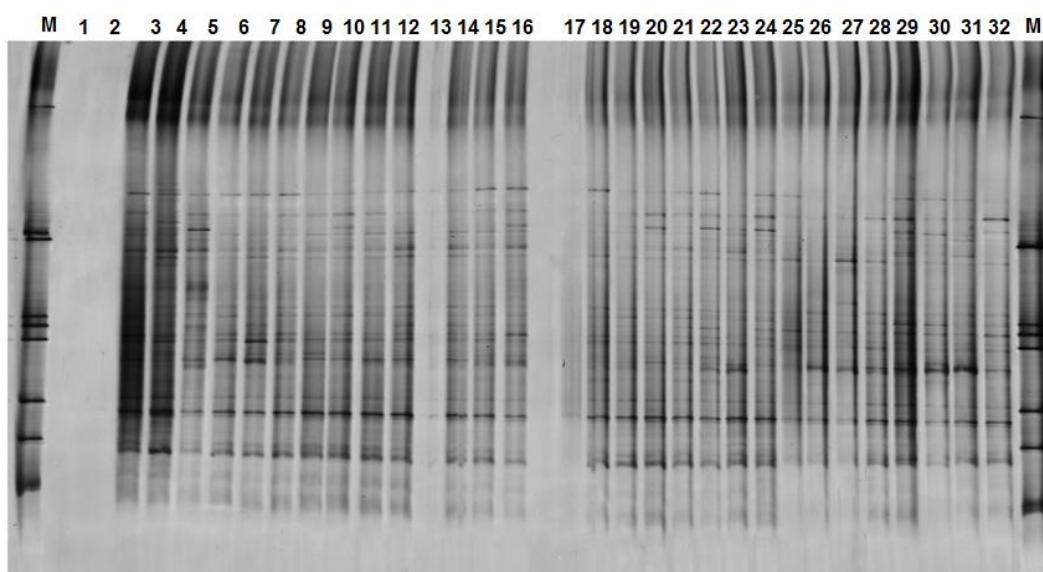


Figura 42. Perfiles electroforéticos de *Betaproteobacteria* para los distintos tratamientos evaluados. Los perfiles se obtuvieron mediante electroforesis en gradiente de desnaturalizante (DGGE). Se utilizó un gel de poliacrilamida 9% con un gradiente de urea-formamida (46,5-65%) para la separación. Las calles indicadas como M corresponden al marcador utilizado. Los números de las muestras sembradas en cada calle se corresponden con las identidades indicadas en la Tabla 1. Las calles vacías (1, 2, 13 y 17) corresponden a muestras que no pudieron ser amplificadas. Descripción de las calles: **1-4:** Corte/4 días; **5-8:** Glifosato/4 días; **9-12:** Corte/10 días; **13-16:** Glifosato/10 días; **17-20:** Corte/17 días; **21-24:** Glifosato/17 días; **25-28:** Corte/26 días; **29-32:** Glifosato/26 días.

El análisis Pearson-UPGMA de perfiles correspondientes a *Betaproteobacteria* indica una cierta variabilidad entre réplicas del mismo tratamiento (mismo color, Figura 43)

CAPÍTULO 4

observándose que algunas de ellas presentan mayor similitud con muestras de diferente tratamiento. Asimismo, el conjunto de muestras correspondientes al método de corte (C.4D, C.10D, C.17D, C.26D) y el conjunto de muestras del método con glifosato (G.4D, G.10D, G.17D, G.26D) no forman dos *clusters* separados que reflejen un efecto principal del método de finalización. Esta observación en el dendrograma se refleja en el test estadístico de permutación que indica un efecto no significativo del factor método ($P > 0,05$, Tabla 49). Contrariamente, los perfiles correspondientes a una misma fecha de muestreo tienden a agrupar separadamente en el dendrograma, esto se observa más claramente al comparar 17 días (C.17, G.17D) contra 26 días (C.26D, G.26D). El test de permutación confirmó esta tendencia arrojando un efecto significativo de la fecha de muestreo ($P < 0,05$, Tabla 49). Dado que el análisis anterior no brinda información sobre una posible interacción entre ambos factores, se realizó una comparación entre los dos métodos de finalización para cada fecha de muestreo por separado, de modo de evitar la influencia de la fecha de muestreo en caso de existir una interacción significativa. Como se indica en la Tabla 50, sólo se detectó una diferencia significativa a los 10 días ($P < 0,05$). En cambio, a los 4 días la diferencia resultó marginalmente significativa ($P = 0,067$, Tabla 50) mientras que para 17 y 26 días no se observaron diferencias ($P > 0,05$).

Tabla 49. Efectos del método de finalización (M) y de la fecha de muestreo (S) en el análisis de perfiles de *Betaproteobacteria*. Los resultados corresponden al test de permutación (10^4 permutaciones). Valores de $P < 0,05$ indican significancia estadística.

Test de permutación	<i>d</i>	<i>P-value</i>
Efecto del método de finalización (M)	0,078	0,09
Efecto de la fecha de muestreo (S)	18,49	0

Tabla 50. Comparación de perfiles de *Betaproteobacteria* entre métodos de finalización en las diferentes fechas de muestreo. Los resultados corresponden al test de permutación (10^4 permutaciones). Valores de $P < 0,05$ indican significancia estadística.

	4 días		10 días		17 días		26 días	
Glifosato vs Corte	<i>d</i>	<i>P-value</i>	<i>d</i>	<i>P-value</i>	<i>d</i>	<i>P-value</i>	<i>d</i>	<i>P-value</i>
	24,62	0,067	16,03	0,027	0,22	0,42	0,51	0,43

En forma complementaria, se realizó un segundo análisis basado en la comparación de agrupamientos definidos a un nivel de similitud (*cut-off*) del 60% (en lugar de evaluar *clusters* definidos según el tratamiento de las muestras, como se realizó anteriormente). En este caso, a un nivel de similitud del 60% pueden diferenciarse claramente cuatro agrupamientos que se encuentran indicados en líneas de color gris claro en las ramas del dendrograma de la Figura 43. El test de permutación indicó significancia estadística de los

agrupamientos formados ($d=25,82$; $P=0$) al igual que el método de re-muestreo Jackknife que indicó un 100% de estabilidad de los *clusters*. Si se observan individualmente cada uno de ellos, puede apreciarse que para la primera fecha de muestreo (4 días) las réplicas correspondientes a ambos métodos de finalización se ubican en *clusters* separados. Lo mismo ocurre a los 10 días. En cambio, esta tendencia no se observa para las últimas fechas (17 y 26 días). Los resultados de este análisis son consistentes con los mencionados anteriormente para cada fecha por separado (Tabla 50), donde los valores de probabilidad asociada para el test de permutación fueron significativos o marginalmente significativos (a los 10 días y 4 días, respectivamente).

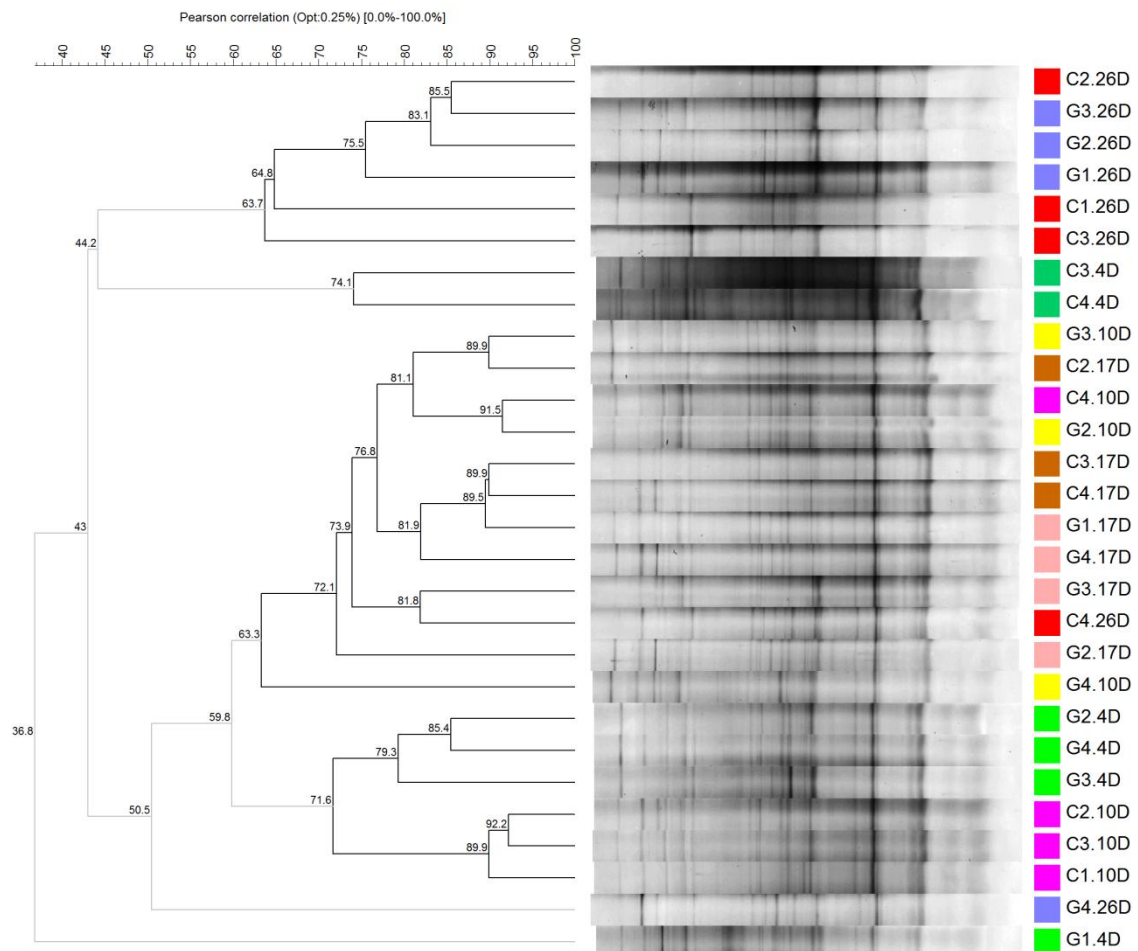


Figura 43. Análisis de agrupamientos de perfiles de *Betaproteobacteria*. Los perfiles se obtuvieron mediante electroforesis en gradiente de desnaturalizante (DGGE). Se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson (r) como coeficiente de similitud y el algoritmo de agrupamiento jerárquico UPGMA. Las ramas en color gris claro señalan los agrupamientos con estabilidad interna (100%) según el método Jackknife, definidos a un 60% de similitud (*cut-off*). Para cada perfil, la letra C indica el método de corte y la letra G el método con glifosato. El número luego de las letras indica la réplica, mientras que el número después del punto indica la fecha de muestreo (4D: 4 días; 10D: 10 días; 17D: 17 días; 26D: 26 días). El número a la derecha de cada nodo indica el coeficiente de correlación cofenética y el número de la izquierda el porcentaje de similitud ($r \times 100$).

5.2.4 Análisis molecular de elementos genéticos móviles

En esta última sección se presentan los resultados obtenidos a partir de la detección y cuantificación de dos clases de EGMs muy importantes para la adaptación y diversificación en comunidades microbianas: los plásmidos IncP-1 y los integrones. Como se mencionó en la Introducción General, estos EGMs han comenzado a ser estudiados frente a diferentes pesticidas debido a que se ha observado que en muchos casos existe un enriquecimiento en ambientes expuestos. En la Sección 6 se discutirá este tema en particular.

En primer lugar se hará referencia a los intentos iniciales de cuantificación de plásmidos IncP-1 mediante protocolos de qPCR ya optimizados en estudios previos, para luego presentar los resultados de la detección mediante PCR-Southern Blot, una metodología alternativa que ha encontrado una amplia aplicación en el estudio de EGMs de muestras ambientales.

5.2.4.1 Cuantificación de plásmidos IncP-1

Los resultados obtenidos mediante qPCR indicaron que existe una baja abundancia de plásmidos IncP-1 en la rizosfera de plantas tratadas y no tratadas con glifosato. Los valores del parámetro C_t en todos los casos fueron altos y muy similares al control negativo. En algunos casos directamente no se reportaron valores de C_t (Anexo IV, Tabla 72). Los estándares usados para la construcción de la curva de calibrado amplificaron correctamente con una eficiencia apropiada, tal como lo indicó la ecuación de la curva luego del ajuste:

$$C_t = 48,33 - 3,16 \log_{10} (\text{copias } korB) \quad (R^2=0,99; \text{Eficiencia}=107,14\%)$$

Estos resultados fueron observados tanto para muestras del ADN diluidas como sin diluir, indicando que no existieron problemas de inhibición. Considerando que la amplificación mediante qPCR no fue posible, se recurrió a un método basado en hibridación (PCR-Southern blot) de manera tal de incrementar la sensibilidad de la detección, tal como se describe en la siguiente sección. Se trata de un método semicuantitativo pero altamente específico y sensible en la detección (presencia/ausencia) de plásmidos IncP-1 en muestras de ADN de suelo.

5.2.4.2 Detección de plásmidos IncP-1 mediante PCR-Southern blot

La metodología PCR-Southern blot mostró ser más sensible en la detección de plásmidos IncP-1 que la qPCR. Se observó la presencia de plásmidos IncP-1 (subgrupos α , β y ϵ , sin diferenciar entre ellos) en ambos métodos y a las distintas fechas de muestreo (Figura 44). No obstante, para la última fecha de muestreo se observó una diferencia en la intensidad de la señal de hibridación entre ambos métodos de finalización que no se observó en las

demás fechas. Si bien el método es semicuantitativo y no es posible determinar cuantitativamente la magnitud de esta diferencia, el resultado constituyó un primer indicio de diferencias en la abundancia de plásmidos IncP-1 entre el método de corte y el método con glifosato. La fecha de muestreo para la cual se observó la diferencia coincide con la fecha en la cual se observaron múltiples diferencias en los análisis anteriores (26 días). Ello se discutirá en la Sección 6.

Asimismo, se observó una menor intensidad en la señal de hibridación para el método de finalización de corte en la última fecha de muestreo comparada con las fechas anteriores. Así, por ejemplo, al comparar 4 y 26 días se observa que la abundancia no parece modificarse en el método con glifosato, y en cambio, se reduce notablemente en el método de corte al alcanzar los 26 días. Es decir, para el método de corte la abundancia al final del ensayo tiende a diferenciarse de la fecha inicial (4 días). Esto es similar a lo observado en el análisis multivariado de los perfiles fisiológicos (Figura 25) donde en el método con glifosato se observó una mayor similitud entre 26 días y 4 días en comparación con lo que ocurre en el método de corte.

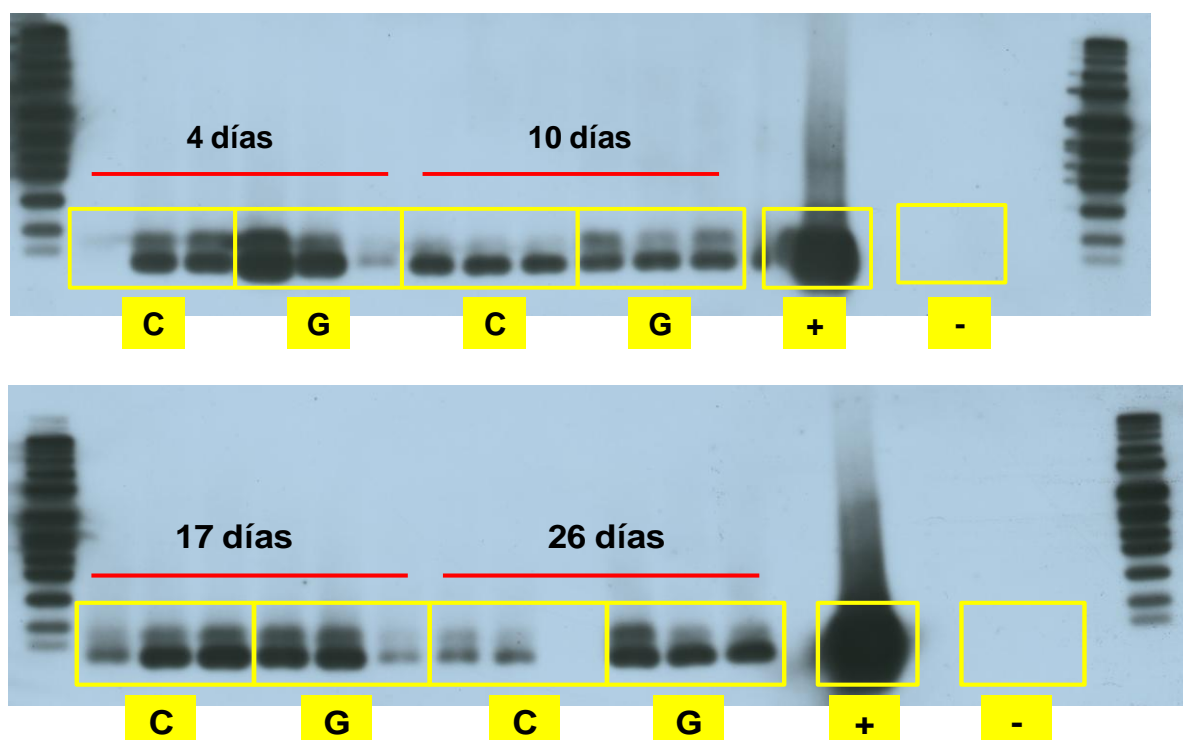


Figura 44. PCR-Southern blot utilizando un mix de sondas específicas para los subgrupo α , β y ϵ de plásmidos IncP-1. Las letras por debajo de los recuadros indican el método de finalización (C=corte; G=glifosato). Las calles en los extremos corresponden al marcador (DIGVII). El control positivo (+) corresponde al producto de PCR amplificado de un plásmido IncP-1 β (plásmido R751). En el control negativo (-) no se detectó ninguna señal. El tiempo de exposición fue de 30 min. Para mayores tiempos de exposición no se observaron bandas adicionales y la saturación impidió la correcta visualización de las muestras.

Cuando se utilizó una sonda específica para el subgrupo β de plásmidos IncP-1, los resultados fueron diferentes a los anteriores. En este caso, sólo se detectaron plásmidos a partir de la segunda fecha de muestreo (10, 17 y 26 días) y la mayor diferencia entre los dos métodos de finalización se observó a los 10 días. Para esta fecha, sólo se detectaron plásmidos IncP1- β en el método de finalización con glifosato (Figura 45). Esta presencia/ausencia se observa en la misma fecha de muestreo en la cual se observó un efecto significativo del método de finalización en la estructura de la comunidad de *Betaproteobacteria*. La detección de plásmidos IncP-1 registrada a los 10 días (señal de hibridación intensa) parece revertirse hacia los 26 días post-tratamiento (baja o nula señal de hibridación) en el caso del método con glifosato. En cambio, ello no ocurre en el método de corte, donde estos plásmidos no se detectan inicialmente pero sí en las últimas fechas (17 y 26 días).

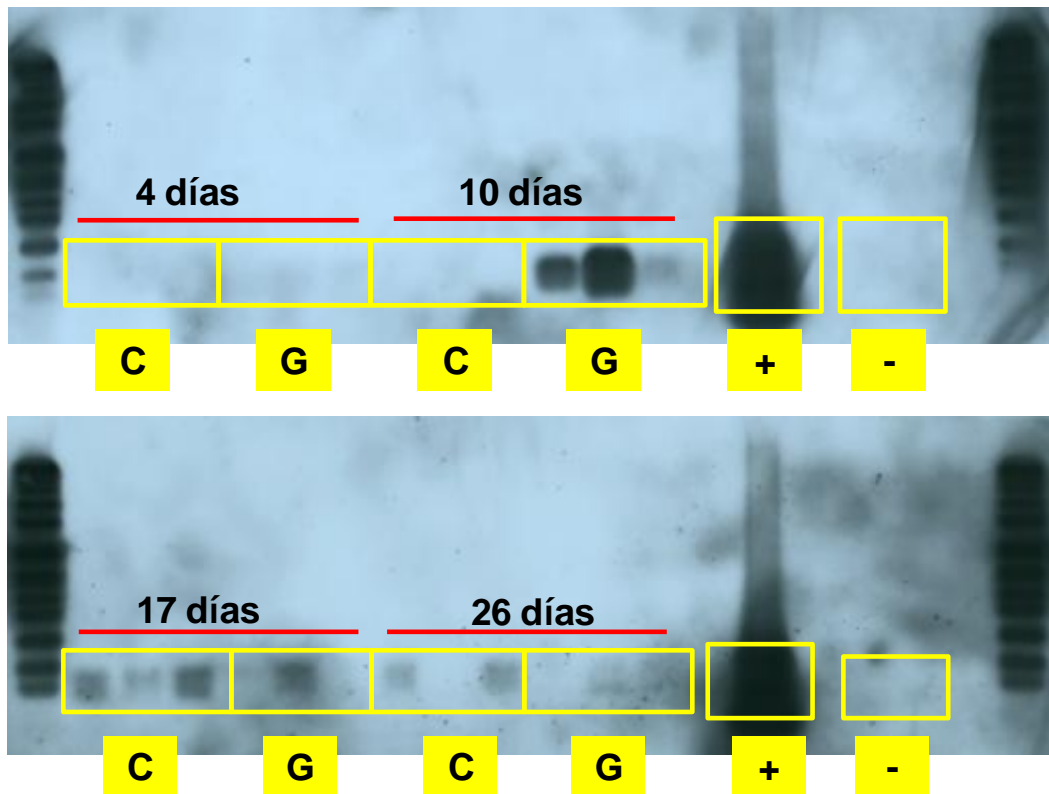


Figura 45. PCR-Southern blot utilizando una sonda específica para el subgrupo β de plásmidos IncP-1. Las letras por debajo de los recuadros indican el método de finalización (C=corte; G=con glifosato). Las calles en los extremos corresponden al marcador (DIGVII). El control positivo (+) corresponde al producto de PCR amplificado de un plásmido IncP-1 β (plásmido R751). En el control negativo (-) no se detectó ninguna señal. El tiempo de exposición fue de 30 min. Para mayores tiempos de exposición no se observaron bandas adicionales y la saturación impidió la correcta visualización de las muestras.

En el caso del subgrupo ϵ (Figura 46), al igual que para el subgrupo β , se observa nuevamente un caso de presencia/ausencia de plásmidos en una de las fechas de muestreo al comparar los dos métodos finalización. Sin embargo, no se presenta a los 10 días sino en la última fecha (26 días). A diferencia del subgrupo anterior, este subgrupo de plásmidos IncP-1 se detecta en las muestras provenientes de ambos métodos desde el inicio (4 días). Al comparar la primera y la última fecha se evidencia aquí también, claramente, la tendencia observada en las hibridaciones anteriores: sólo las muestras provenientes del método con glifosato se asemejan a su condición inicial luego de 26 días. En cambio, las muestras provenientes del método de corte a los 26 días (ausencia de plásmidos) se diferencian de las más tempranas (4 días, presencia de plásmidos).

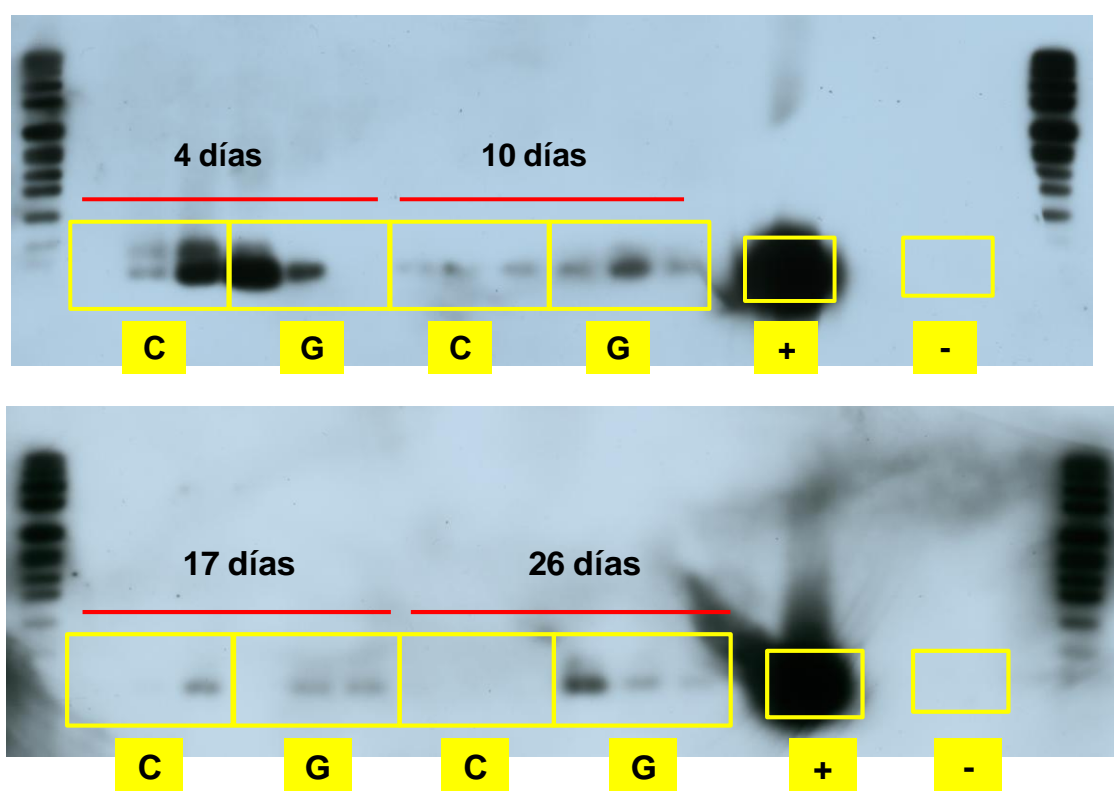


Figura 46. PCR-Southern blot utilizando una sonda específica para el subgrupo ϵ de plásmidos IncP-1 ϵ . Las letras por debajo de los recuadros indican el método de finalización (C=corte; G=glifosato). Las calles en los extremos corresponden al marcador (DIGVII). El control positivo (+) corresponde al producto de PCR amplificado de un plásmido IncP-1 ϵ (plásmido pKJK5). En el control negativo (-) no se detectó ninguna señal. El tiempo de exposición de la membrana fue de 30 min. Para mayores tiempos de exposición no se observaron bandas adicionales y la saturación impidió la correcta visualización de las muestras.

Para el subgrupo δ de plásmidos IncP-1, se detectó una señal de hibridación sólo en dos muestras: una réplica correspondiente al método de corte a los 4 días, y una réplica del

método con glifosato a los 26 días (Figura 47). Esta observación indica que el subgrupo δ presenta una muy baja abundancia en la rizosfera en comparación con los otros subgrupos presentados anteriormente.

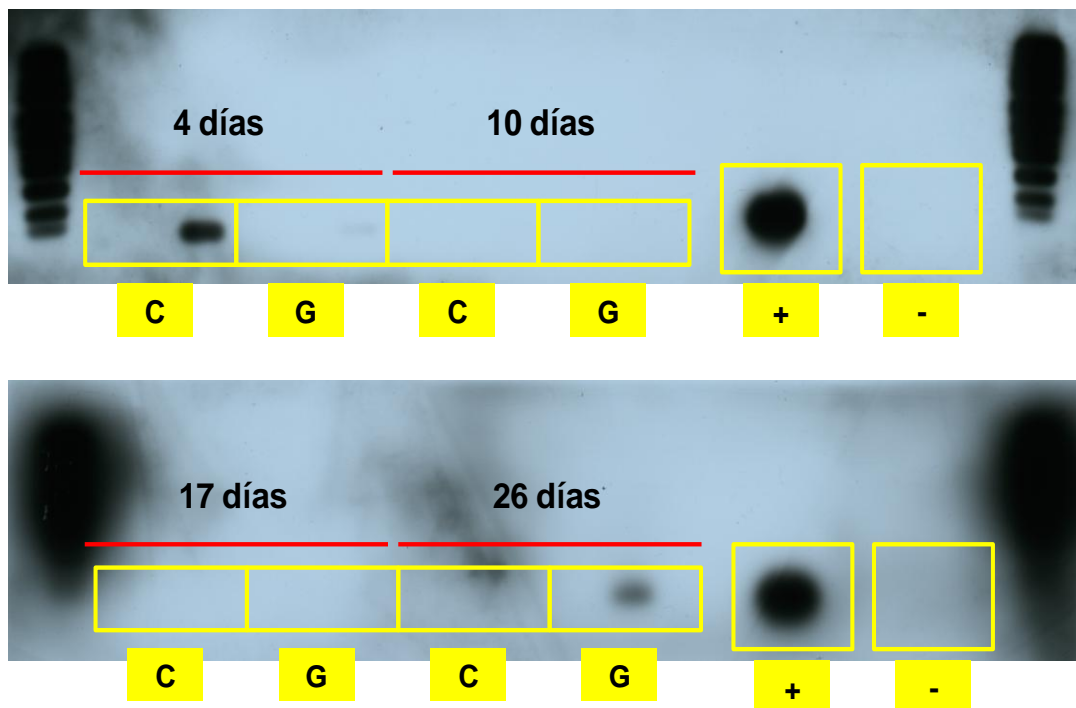


Figura 47. PCR-Southern blot utilizando una sonda específica para el subgrupo δ de plásmidos IncP-1. Las letras por debajo de los recuadros indican el método de finalización (C=corte; G=glifosato). Las calles en los extremos corresponden al marcador (DIGVII). El control positivo (+) corresponde al producto de PCR amplificado de un plásmido IncP-1 δ (plásmido pEST 4011). En el control negativo (-) no se detectó ninguna señal. El tiempo de exposición de la membrana fue de 30 min. Para mayores tiempos de exposición no se observaron bandas adicionales y la saturación impidió la correcta visualización de las muestras.

5.2.4.3 Cuantificación de integrones de clase I

La determinación de la abundancia relativa del gen *intI1* (*intI1* / *ARNr 16S*) indicó que el número de copias de dicho gen se encuentra por debajo del límite de detección de la qPCR para las dos primeras fechas de muestreo (4 y 10 días), detectándose sólo a los 17 y 26 días (Figura 48). Para ninguna de las dos fechas se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos métodos de finalización ($P > 0,05$).

Las ecuaciones correspondientes a las curvas estándar y a las eficiencias de amplificación para los genes *intI1* y el gen del ARNr 16S fueron las siguientes:

$$\text{intI1} \quad Ct = 37,55 - 3,23 [N^{\circ} \text{ copias}] \quad (R^2 = 0,99) \quad \text{Eficiencia} = 108,1\%$$

$$\text{ARNr 16S} \quad Ct = 44,99 - 3,34 [N^{\circ} \text{ copias}] \quad (R^2 = 0,99) \quad \text{Eficiencia} = 99,3\%$$

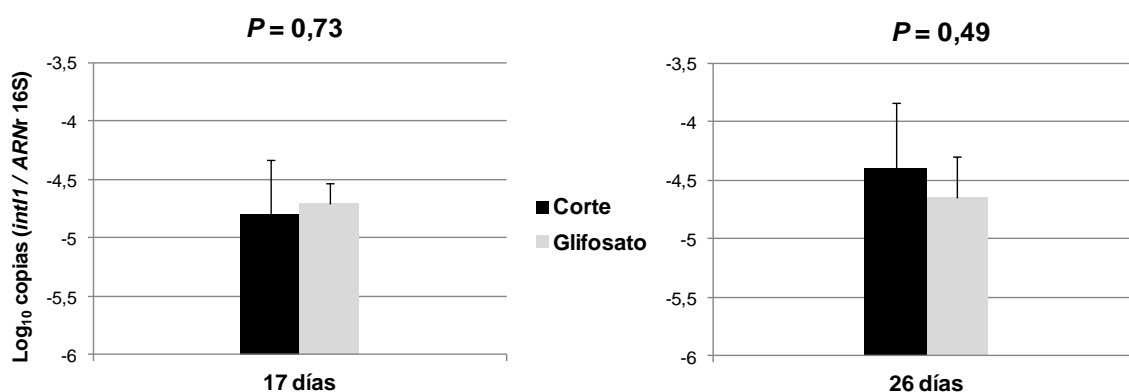


Figura 48. Cuantificación de integrones de clase I mediante PCR cuantitativa (qPCR). Se indica la media del número de copias del gen *intI1* expresado en forma relativa al gen del ARNr 16S (\log_{10}). Las barras de error corresponden al error estándar de la media ($n=4$). Valores inferiores a -5 se consideran por debajo del límite de detección, tal como ocurrió para 4 y 10 días (no se muestran). Los valores de probabilidad asociada corresponden a la comparación mediante el test-t para muestras independientes. Valores de $P < 0,05$ indican diferencias estadísticamente significativas entre métodos de finalización.

6. Discusión

El trabajo presentado abordó por primera vez los efectos de la desecación química de *A. sativa* con glifosato, a nivel de la microbiota rizosférica, en relación a un método de finalización sin herbicida (corte). Para ello se utilizaron diversas herramientas de estudio de comunidades microbianas independientes de cultivo, tanto fisiológicas como moleculares. Asimismo, se analizaron por primera vez los efectos diferenciales de ambos métodos de finalización sobre la presencia/ausencia de plásmidos IncP-1 de diferentes subgrupos y sobre la abundancia de integrones de clase I. Los resultados obtenidos indicaron que las comunidades microbianas son influenciadas diferencialmente por el método de finalización aplicado, observándose estas diferencias a nivel fisiológico, en la abundancia de grupos específicos de microorganismos (entre ellos, BOA y AOA) y en la presencia/ausencia de plásmidos IncP-1 β y ϵ . En esta sección se discutirán detalladamente los resultados de las diferentes metodologías de análisis de comunidades microbianas. Asimismo, se establecerán relaciones entre ellos y con diversas publicaciones al respecto, incluyendo aquellas más recientes.

6.1 Análisis de perfiles fisiológicos de las comunidades

El análisis de los perfiles obtenidos (Figura 27) indicó similitudes con los resultados reportados por Mijangos *et al.* (2009) en triticale, tanto en lo referido a la fecha particular en la cual se detectó el mayor número de diferencias entre ambos métodos (26 días), como así también en la proporción de sustratos que mostraron diferencias en su nivel de utilización

por parte de la comunidad microbiana. En el presente trabajo se detectaron incrementos significativos en los nueve compuestos evaluados a los 26 días (Figura 27, Tabla 26); de manera similar Mijangos *et al.* (2009), utilizando el sistema Biolog, reportaron diferencias en 16 de los 31 sustratos analizados a los 30 días en rizosfera de plantas de triticale tratadas con glifosato respecto de plantas sometidas a corte. Cuatro de aquellos 16 sustratos (L-asparagina, L-fenilalanina, D-celobiosa y D-xilosa) son los mismos sustratos para los cuales se encontraron diferencias en este estudio a los 26 días (Figura 27, Tabla 26), y dos de ellos (ácido 4-hidroxibenzoico y el metil-éster del ácido pirúvico) están químicamente relacionados con dos de los sustratos aquí analizados (ácido *p*-cumárico y ácido pirúvico, respectivamente). No obstante estas similitudes, la principal diferencia radica en que en el presente trabajo se observó una respuesta incrementada en las muestras provenientes del método con glifosato respecto del método de corte, mientras que Mijangos *et al.* (2009) reportaron un comportamiento opuesto con el sistema Biolog (menores valores en el método con glifosato). Dado que las mediciones en el sistema Biolog no corresponden a medidas de SIR, no es esperable la misma tendencia en los resultados observados para cada sustrato en relación al sistema BDOBS. Si se tiene en cuenta que el glifosato puede modificar la cantidad y calidad de los exudados radicales incrementando el contenido de carbohidratos y aminoácidos (Kremer *et al.*, 2005) y posiblemente de otros compuestos (entre ellos, compuestos fenólicos, como se discutirá más adelante), es esperable entonces una mayor actividad de las comunidades microbianas de la rizosfera de plantas tratadas con el herbicida, reflejándose en la respuesta respiratoria inducida (SIR). Asimismo, la estimulación de la SIR para todos los sustratos evaluados es consistente con resultados de un análisis metatranscriptómico publicados recientemente por Newman *et al.* (2016b), quienes reportaron que un amplio porcentaje de los genes regulados positivamente frente a glifosato en rizosfera de maíz están directamente involucrados en la respiración celular. La respuesta respiratoria incrementada para todos los sustratos en el método con glifosato refleja una mayor actividad microbiana que podría explicarse también por la contribución a los rizodepósitos del C derivado de la muerte progresiva del tejido radicular senescente. De acuerdo con Imparato *et al.* (2016), la muerte progresiva de las raíces en plantas tratadas con el herbicida provoca la liberación de sustratos carbonados que son rápidamente utilizados por la comunidad microbiana. Por lo tanto, los resultados obtenidos son consistentes también con las conclusiones de Imparato *et al.* (2016).

La respuesta respiratoria incrementada con Tween 20 en muestras provenientes del método con glifosato respecto del método de corte constituye otro resultado relevante (Figura 27). Este compuesto pertenece a una clase de reconocidos surfactantes no iónicos

que ya han sido considerados en otro estudio vinculado a los efectos de FC de glifosato en comunidades microbianas de la rizosfera (Mijangos *et al.*, 2009). Tween 20 es el único compuesto de origen antrópico evaluado y el único que mostró diferencias en tres de las cuatro fechas de muestreo. Por lo tanto, el incremento observado en la SIR estaría relacionado con una mayor abundancia de microorganismos capaces de la utilización rápida de Tween 20 en la rizosfera de plantas tratadas con glifosato. Este resultado deberá estudiarse más detalladamente en futuros estudios para determinar qué grado de relación existe con la posible presencia de este tipo de compuestos entre los aditivos del formulado.

En lo que respecta a la diversidad catabólica, evaluada mediante la equitatividad de uso de sustratos (E) (Degens *et al.*, 2001) y mediante el índice de Shannon-Weaver (H'), los resultados indicaron valores significativamente mayores en la última fecha de muestreo en el método con glifosato en relación al método de corte (Figura 28). La diferencia en la diversidad catabólica entre ambos métodos se presentó aquí sólo a los 26 días, de manera similar a lo reportado en triticale por Mijangos *et al.* (2009), quienes detectaron diferencias a los 30 días pero no a los 15 días en rizosfera de triticale. Asimismo, el resultado observado para los dos índices mencionados en la última fecha de muestreo coincide con lo observado en el ordenamiento multivariado donde se detectó una separación a los 26 días (Figura 25 y 26). Si bien se observa una similitud con Mijangos *et al.* (2009) respecto del período de tiempo post-tratamiento luego del cual se presentan estas diferencias, la tendencia de la respuesta es diferente: en triticale reportaron una disminución de la diversidad catabólica al aplicar glifosato, mientras que en este trabajo se observó un incremento. Esto podría deberse a las diferentes metodologías y parámetros de medición empleados (como se comentó anteriormente), pero también a diferencias en las especies vegetales estudiadas y a diferencias en la diversidad microbiana de las comunidades presentes en los suelos utilizados en cada ensayo.

Como se comentó en la Sección 5.1.2, la riqueza no presentó diferencias en el análisis fisiológico ya que todos los sustratos fueron utilizados en todos los tratamientos. Por lo tanto, la observación de una tendencia similar para la equitatividad y para el índice de diversidad catabólica es esperable si se tiene en cuenta que este último se compone tanto de la equitatividad como de la riqueza (Kennedy y Smith, 1995).

Es importante destacar la tendencia observada a lo largo de tiempo: los parámetros de diversidad funcional evaluados disminuyen significativamente a los 10 días en ambos métodos de finalización respecto de la fecha inicial de muestreo (4 días). Sin embargo, en el método con glifosato vuelven a aumentar y a los 26 días la diferencia respecto de 4 días no es significativa (Figura 28). En cambio, en el método de corte, continúan adquiriendo valores

significativamente menores a los 26 días. Esta tendencia es igual a la observada en el ordenamiento de los perfiles, tal como se discutirá a continuación.

Las disminuciones en el parámetro E se observan normalmente frente a diversos eventos desfavorables a los que se enfrentan las comunidades microbianas, particularmente cuando la intensidad del estrés o la perturbación es alta (Degens *et al.*, 2001). Dado que la disminución se observa para ambos métodos de finalización a los 10 días, es posible suponer que, transcurrido ese tiempo, las comunidades microbianas enfrentan una situación desfavorable transitoria post-tratamiento que reduce la diversidad catabólica. En otras palabras, a los 10 días se detecta la primera manifestación significativa de la perturbación (a nivel fisiológico de las comunidades) ocasionada tanto por el corte de la planta como por la aplicación de glifosato.

El ACP (Figuras 25 y 26) indicó la mayor separación entre los perfiles correspondientes a ambos métodos de finalización en la última fecha de muestreo (26 días). La misma tendencia fue observada por Mijangos *et al.* (2009) en un ACP de perfiles fisiológicos Biolog, a una dosis mayor (5 kg IA ha^{-1}) a la evaluada en esta Tesis. En el trabajo mencionado, las muestras correspondientes al método de corte se ordenaron separadamente respecto de las muestras provenientes del tratamiento con glifosato a los 30 días pero no en una fecha anterior (15 días). Más aún, en un estudio de comunidades microbianas de la rizosfera de soja RR (Arango *et al.*, 2014) a una dosis menor (1 kg ha^{-1}), se observó también una tendencia similar al realizar un ACP de los datos obtenidos mediante T-RFLP (estructura de la comunidad), comparando tratamientos con y sin glifosato en diferentes fechas de muestreo. Por otro lado, un aspecto interesante de destacar es que los sustratos contribuyen a la CP1 en porcentajes similares (Anexo IV, Tabla 56). En otras palabras, los perfiles que se separan en el ordenamiento lo hacen en base a las respuestas de los múltiples sustratos evaluados y no por la contribución principal de unos pocos sustratos diferencialmente utilizados. En el ACP también se observa que las muestras del método con glifosato a los 4 y 26 días presentan claramente una mayor respuesta respiratoria para todos los sustratos en comparación con las provenientes del método de corte. En particular, para estas muestras se observa una respuesta más elevada con sarcosina, el producto de la degradación de glifosato en el suelo por medio de la actividad C-P liasa. La vía de la sarcosina se encuentra presente en muchos aislamientos de bacterias y hongos del suelo capaces de degradar glifosato (Dick y Quinn, 1995). Por lo tanto, el resultado observado podría reflejar una mayor abundancia de bacterias y hongos capaces de degradar el glifosato exudado en el método de finalización con el herbicida, adaptados a la utilización rápida de la sarcosina resultante de la actividad C-P liasa.

La respuesta respiratoria de las comunidades microbianas a los exudados radicales obtenidos de plantas sometidas a corte (Ex_C) o a desecación con glifosato (Ex_G) mostró una tendencia claramente diferente a los 26 días dependiendo del método de finalización (Figura 30). Mientras que en el método de corte la respuesta se incrementó significativamente en presencia del Ex_G (Figura 30A) en el método con glifosato (Figura 30B) la respuesta disminuyó. Zabaloy *et al.* (2012) observaron la misma tendencia en microcosmos de un suelo no rizosférico con larga historia de exposición a glifosato respecto de un suelo prístino, con glifosato como sustrato. La mayor respuesta respiratoria frente al Ex_G en comunidades microbianas no expuestas previamente a glifosato (en este caso las del método de corte, Figura 30A, 26 días) indicaría una condición de estrés metabólico. En cambio, la disminución en comunidades expuestas al herbicida (Figura 30B, 26 días) indicaría una comunidad adaptada a la asimilación de los productos de la degradación cometabólica del glifosato, más que a su respiración, tal como propusieron originalmente Zabaloy *et al.* (2012). Esta tendencia (disminución) en plantas tratadas con glifosato se observa luego de 4 días y luego de 26 días, posiblemente debido a que durante estos períodos de tiempo las comunidades han estado expuestas a las mayores concentraciones de glifosato en los rizodepósitos, aunque el origen de dicha exposición sería diferente en cada caso. Mientras que a los 4 días se explicaría por una tasa de exudación mayor que para el resto de las fechas (Kremer *et al.*, 2005), a los 26 días se explicaría principalmente por la liberación de glifosato de raíces senescentes (en decaimiento progresivo por necrosis) hacia los rizodepósitos. En fechas intermedias, el incremento en la respuesta respiratoria con Ex_G respecto de Ex_C se observa tanto para el método de corte (Figura 30A) como para el método con glifosato (Figura 30B). Esto indicaría una perturbación (introducida por el Ex_G) común para las comunidades microbianas rizosféricas de plantas finalizadas con uno y otro método, posiblemente no relacionada con glifosato. Este último resultado sería consistente con los resultados observados para el parámetro E (Figura 28), donde para ambos métodos se observan menores valores a los 10 y 17 días respecto de 4 días. Una menor equitatividad a los 10 y 17 días podría resultar en comunidades temporalmente menos resistentes a perturbaciones (Degens *et al.*, 2001), por ejemplo, a perturbaciones resultantes de determinados compuestos químicos presentes en el Ex_G cuya exudación ha sido estimulada por glifosato. Entre ellos podrían encontrarse ciertos compuestos fenólicos. La reconocida estimulación de la actividad fenilalanina amonio liasa (PAL) por parte del glifosato en las raíces de plantas de maíz y soja tratadas con el herbicida (Duke y Hoagland, 1978) podría indicar una exudación incrementada de compuestos fenólicos inhibitorios con efectos biológicos importantes como los fenilpropanoides. Si bien esta estimulación de la actividad

PAL ha sido estudiada previamente (Duke y Hoagland, 1978; Duke *et al.*, 1980), y se ha determinado que ciertos compuestos como el cinamato inducen un estrés en las comunidades microbianas (Wu *et al.*, 2009), no se ha propuesto ni investigado aún un posible mecanismo indirecto de impacto de glifosato en comunidades microbianas de la rizosfera de plantas sensibles basado en la exudación incrementada de compuestos fenólicos. En esta Tesis se propone por primera vez que la exudación de compuestos fenólicos resultante de la actividad PAL, incrementada en plantas tratadas con glifosato, ocasiona un estrés en las comunidades microbianas rizosféricas, hipótesis que deberá demostrarse en próximos estudios. Más adelante en esta discusión se hará referencia a ello, al igual que en la discusión final.

Finalmente, en lo que respecta al parámetro $RQ_{\text{Ácido } p\text{-cumárico}}$, no se observaron diferencias entre ambos métodos de finalización (Figura 29). Se decidió analizar comparativamente este indicador dado que se observó un incremento en el mismo tipo de suelo (del mismo sitio) frente a aplicaciones repetidas del herbicida (tanto IA como FC) (Sección 5.1 del Capítulo 2). La diferencia en la tendencia observada aquí, respecto de lo expuesto en el Capítulo 2, sugiere que el $RQ_{\text{Ácido } p\text{-cumárico}}$ podría ser sensible en suelo no rizosférico (*bulk soil*) y frente a aplicaciones acumulativas mientras que no parecería mostrar la misma sensibilidad como indicador en suelo rizosférico. Este comportamiento podría deberse a la gran diferencia que existe, en múltiples aspectos, entre el suelo rizosférico y no rizosférico. Así por ejemplo, tanto la diversidad microbiana como su actividad es notablemente diferente debido a lo que se conoce como “efecto rizosférico” (*rhizosphere effect*) y por ende, no deberían esperarse las mismas respuestas en ciertos indicadores. Las comunidades microbianas de la rizosfera suelen ser menos diversas, más abundantes y de mayor actividad que las del suelo no rizosférico (Berendsen *et al.*, 2014). Por otra parte, las concentraciones de glifosato a las que se encuentran expuestas las comunidades microbianas en uno y otro caso podrían ser muy diferentes, sobre todo si se tiene en cuenta que en este estudio no existe una aplicación directa a la superficie del suelo desnudo, como sí ocurrió en microcosmos en el Capítulo 2 y 3. En cambio, tiene lugar la exposición mediada por los exudados, ausentes en microcosmos.

6.2 Consideraciones adicionales sobre el análisis fisiológico

Un componente importante de la microbiota rizosférica que no ha sido abordado específicamente en este estudio pero que se encuentra representado en los perfiles fisiológicos presentados en la Sección 5.1.1 son las levaduras de la rizosfera (tanto dentro de *Ascomycota* como de *Basidiomycota*). Al menos 7 de los 9 sustratos evaluados (L-

fenilalanina, L-asparagina, D-xilosa, D-celobiosa, ácido pirúvico, ácido fumárico y ácido *p*-cumárico) han sido reconocidos como sustratos presentes en los exudados radicales ampliamente utilizados por levaduras (Botha, 2006; Botha 2011). Por lo tanto, la exudación incrementada de aminoácidos y carbohidratos en la rizosfera de plantas tratadas con glifosato podría estimular la actividad de levaduras. De hecho, el mismo glifosato presente en los exudados podría ser utilizado como fuente de C y energía ya que se ha observado esta capacidad en especies como *Yarrowia lipolytica* y *Candida krusei* (Romero *et al.*, 2004). La exudación incrementada de carbohidratos frente al tratamiento con glifosato podría ser particularmente relevante para levaduras rizosféricas dado que muchas de ellas poseen la capacidad de fermentar diversos compuestos de este tipo (Botha, 2010). Se ha observado que en la rizosfera pueden desarrollarse zonas de muy baja presión parcial de oxígeno debido al consumo del mismo no sólo por las raíces sino también por la alta actividad microbiana producto de los diversos compuestos carbonados presentes en los rizodepósitos (Højberg y Sorensen, 1993). Estas condiciones serían favorables para levaduras fermentadoras. Las modificaciones en la abundancia y diversidad de levaduras podrían impactar en las comunidades microbianas rizosféricas debido a su importante influencia en diversos niveles tróficos (Botha, 2010). El análisis molecular de las mismas representa un estudio pendiente en CC finalizados con glifosato.

6.3 Análisis de betaproteobacterias mediante PCR-DGGE

De acuerdo con el análisis realizado mediante PCR-DGGE, la estructura de la comunidad de *Betaproteobacteria* presentó diferencias significativas entre métodos de finalización, pero sólo a los 10 días (Tabla 50). Este resultado difiere de la fecha en la cual se observaron diferencias en los perfiles catabólicos y en los parámetros de diversidad funcional (26 días). Sin embargo, coincide con la fecha para la cual ambos métodos de finalización tuvieron los valores más bajos de los parámetros de diversidad funcional (en relación a las demás fechas) (Figura 28). Próximos estudios deberán explorar con mayor profundidad esta coincidencia. Ello permitiría determinar, por ejemplo, si la reducción en la diversidad funcional que se observa para ambos métodos a los 10 días podría estar relacionada, en parte, con la comunidad de betaproteobacterias presente en ese momento en particular, considerando además la alta abundancia relativa de *Betaproteobacteria* en relación a otras clases bacterianas (Figura 37). Asimismo, la fecha de muestreo correspondiente a los 10 días post-tratamiento se destaca también teniendo en cuenta otras dos observaciones: la presencia de plásmidos IncP-1 β en el método con glifosato y la ausencia de los mismos en el método de corte (Figura 45) a los 10 días, y los resultados de Kremer *et al.* (2005) que

indican que a los 10 días (dentro de un período de observación de 16 días) se alcanza un nivel acumulado de glifosato cercano al valor máximo en exudados radicales de plantas sensibles tratadas con el herbicida. Estas observaciones, sumadas al hecho de que muchos plásmidos IncP-1 β portan casetes de genes degradativos para determinados compuestos (Martínez *et al.*, 2001; Adamczyk *et al.*, 2003) incluyendo herbicidas (Top *et al.*, 1995; Trefault *et al.*, 2004) y hasta vías catabólicas (Sen *et al.*, 2011), despierta el interrogante de si la presencia de plásmidos IncP-1 β , únicamente en el método con glifosato, podría responder a la presencia de glifosato exudado a la rizosfera, tal vez interviniendo en su degradación o en la de ciertos compuestos provenientes del tejido radicular de la planta cuya exudación sea estimulada por glifosato. Al respecto, cabe destacar que se han identificado varios plásmidos IncP-1 que portan genes para la degradación de pesticidas como el 2,4-D (plásmidos IncP-1 β y δ ; Top *et al.*, 1995; Trefault *et al.*, 2004; Vedler *et al.*, 2004), atrazina (plásmido IncP-1 β ; Martínez *et al.*, 2001), cloroanilina (plásmido IncP-1 β ; Król *et al.*, 2012) y compuestos aromáticos clorados (plásmidos IncP-1 β ; Sen *et al.*, 2011). Asimismo, en un ensayo en condiciones similares a las de este estudio pero de menor duración (28 días), se han capturado tres plásmidos IncP-1 β en suelo rizosférico de plantas de *A. sativa* tratadas con glifosato mediante conjugación triparental (metodología implementada en Julius-Kühn Institut, Braunschweig, Alemania) cada uno de ellos con la secuencia de inserción IS1070 que se caracteriza por flanquear genes degradativos y con un gen codificante para una enzima lacasa bacteriana (datos no presentados en la Tesis).

Por otro lado, continuando con las observaciones registradas a los 10 días, también resulta interesante la observación de diferencias significativas en la estructura de *Betaproteobacteria* a los 10 días, en simultáneo con la presencia/ausencia de plásmidos IncP-1 β , sobre todo teniendo en cuenta que las betaproteobacterias se encuentran bien representadas (Figura 37) y que los plásmidos IncP-1 pueden replicarse y mantenerse de manera estable en casi todas las bacterias gram-negativas, que incluyen a los miembros de *Betaproteobacteria* (Adamczyk *et al.*, 2003). Aquí también deberá determinarse, en próximos estudios, qué relación podría existir entre las diferencias observadas en la comunidad de betaproteobacterias y la diferencia en abundancia de plásmidos IncP-1 β . La detección de diferencias en la estructura de la comunidad de *Betaproteobacteria* entre ambos métodos a los 10 días pero no a los 26 días indica una diferencia de corta duración o transitoria. El carácter transitorio de estas diferencias en la estructura de la comunidad es consistente con ciertos estudios en los que se observaron respuestas de este tipo utilizando indicadores basados en métodos independientes de cultivo como PLFA, aun cuando dichos estudios fueron realizados en suelo no rizosférico (Ratcliff *et al.*, 2006; Weaver *et al.*, 2007).

6.4 Abundancia de grupos microbianos mediante qPCR

En lo respectivo al análisis de abundancia de BOA, el número de copias significativamente menor del gen *amoA_{BOA}* en el método con glifosato respecto del método de corte (efecto principal promediado para todas las fechas de muestreo) (Tablas 42 y 43) es consistente con la reconocida sensibilidad de este grupo microbiano a diversos contaminantes incluyendo herbicidas (Deni y Penninckx, 1999; Mertens *et al.*, 2006; Hernández *et al.*, 2011; Puglisi *et al.*, 2012; Rousidou *et al.*, 2013; Corbel *et al.*, 2015; Feld *et al.*, 2015). En estudios en microcosmos, Feld *et al.* (2015) también encontraron una reducción significativa en la abundancia de microorganismos oxidantes del amoníaco (tanto BOA como AOA) con el herbicida dazomet.

La menor abundancia de BOA podría responder a su sensibilidad al IA y/o a los adyuvantes presentes en el formulado. Entre estos adyuvantes, los más utilizados en formulaciones de pesticidas son las POEAs. A diferencia del glifosato, cuya exudación ha sido reportada en diversos estudios (Coupland y Caseley, 1975; Rodrigues *et al.*, 1982; Kremer *et al.*, 2005) en el caso de POEAs no se han encontrado estudios donde se analice la exudación de POEAs. Por lo tanto se desconoce si la misma podría tener lugar. En caso de producirse, los efectos inhibitorios podrían estar relacionados con la propia toxicidad de los mismos o bien con la interacción con el IA. A altas concentraciones, ciertos surfactantes no iónicos han demostrado incrementar la movilidad de pesticidas previamente adsorbidos (Krogh *et al.*, 2003).

Anteriormente se mencionó que uno de los mecanismos de acción del glifosato en la planta se basa en la estimulación de la actividad de la enzima PAL en ciertos tejidos, entre ellos en la raíz (Duke y Hoagland, 1978; Duke *et al.*, 1980). La enzima PAL conduce a la producción de amonio y de cinamato, del cual derivan diversos compuestos fenólicos. Algunos de ellos, como ciertos fenilpropanoides, pueden actuar como inhibidores de la nitrificación afectando a BOA y AOA (Subbarao *et al.*, 2015), razón por la cual se conocen como inhibidores biológicos de la nitrificación (IBNs). Esta inhibición de la nitrificación explicaría entonces la menor abundancia de BOA en el método con glifosato, considerando que la actividad nitrificante ha sido recientemente correlacionada con la abundancia de BOA (Zabaloy *et al.*, 2017). La estimulación de la actividad PAL explicaría también, consistentemente, los niveles de amonio aumentados en la rizosfera de plantas sensibles tratadas con glifosato respecto de plantas sometidas a corte reportados por Mijangos *et al.* (2009) en la rizosfera de triticale y de arveja (*Pisum sativum* L. cv. Cartouche). A su vez, esta mayor concentración de amonio podría estimular la liberación de IBNs, considerando que esta liberación se encuentra altamente regulada por la planta y se produce sólo en

presencia de concentraciones altas de amonio en la rizosfera (Subbarao *et al.*, 2015). Los compuestos fenilpropanoides sintetizados a partir de la estimulación de la actividad PAL podrían alcanzar la rizosfera y afectar a microorganismos sensibles, entre ellos, BOA y AOA. Si bien este mecanismo indirecto de perturbación de comunidades microbianas nitrificantes rizosféricas por parte del glifosato no ha sido propuesto en la literatura hasta el momento, deberá abordarse en investigaciones futuras. Damin *et al.* (2010) también sugirieron que la exudación de amonio detectada sería consecuencia de la estimulación de la actividad PAL en tratamientos con glifosato, aunque no evaluaron el impacto en microorganismos de la rizosfera. Otros resultados de investigaciones en rizosfera también podrían relacionarse con una exudación incrementada de compuestos fenólicos hacia la rizosfera. Por ejemplo, en evaluaciones reiteradas durante 10 años, Kremer y Means (2009) reportaron mayores frecuencias de colonización de raíces por *Fusarium* spp. en cultivares GR de soja y maíz tratados con glifosato respecto de los no tratados. Dado que ciertos compuestos fenólicos son capaces de estimular la germinación de esporas fúngicas (ej.: ácido cinámico, el producto de la reacción catalizada por la enzima PAL, Yang *et al.*, 2015) los niveles aumentados en la rizosfera podrían explicar adecuadamente dicha colonización. Este aspecto será retomado en la discusión final de la Tesis.

Como se comentó en el Capítulo 2, la utilización de BOA como potencial biomarcador de impacto de glifosato no había sido considerada hasta el año 2016 cuando se publicó el primer estudio en condiciones de campo incluyendo a este grupo microbiano de gran relevancia en el ciclo del N. En dicho trabajo, no se reportaron efectos de la aplicación de glifosato sólo o combinado con 2,4-D sobre la abundancia de BOA (Zabaloy *et al.*, 2016) en suelo no rizosférico. A nivel de rizosfera de *A. sativa*, no existen reportes del posible impacto de glifosato sobre estos grupos microbianos. Recientemente se han estudiado mediante NGS las modificaciones en la composición de la comunidad bacteriana de la rizosfera de soja y maíz frente a glifosato. Las diferencias más importantes en la abundancia se encontraron a nivel de *Acidobacteria* (disminución) y de *Proteobacteria* (incremento) pero no se analizaron en particular niveles taxonómicos inferiores que incluyan a BOA (Newman *et al.*, 2016a). No obstante, en un estudio similar, Newman *et al.* (2016b) reportaron una regulación negativa de genes involucrados en el metabolismo del nitrógeno mediante una aproximación metagenómica (RNAseq) en rizosfera de maíz. En concordancia con todas las consideraciones mencionadas anteriormente y con este último estudio, los resultados aquí obtenidos resultan novedosos y sugieren la importancia de considerar a los microorganismos oxidantes del amoníaco tanto en suelo rizosférico como no rizosférico.

El análisis de AOA mediante qPCR indicó una abundancia significativamente menor en el método con glifosato a los 26 días (Figura 41). Este resultado es consistente con la reconocida sensibilidad de AOA a pesticidas (Feld *et al.*, 2015). Asimismo, la detección de una diferencia en la última fecha de muestreo coincide con otros resultados que también mostraron ese patrón temporal. Así por ejemplo, la diversidad catabólica difiere significativamente entre ambos métodos únicamente a los 26 días. El ordenamiento de los perfiles fisiológicos también mostró una separación entre corte y glifosato a los 26 días. La abundancia del gen *amoA*_{AOA} fue mayor, en alrededor de dos órdenes de magnitud respecto del gen *amoA*_{BOA}, resultado consistente con otros estudios que indicaron también una mayor abundancia de AOA tanto en suelo rizosférico (Thion *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016) como no rizosférico (Zabaloy *et al.*, 2017). Una posible explicación de ello podría ser el consumo de N por parte de la planta durante el período de crecimiento, lo cual favorecería a las AOA (Thion *et al.*, 2016) que tienen mayor afinidad que las BOA por el amoníaco y son más sensibles a la inhibición por altas concentraciones del mismo (Prosser y Nicol, 2012). Luego de aplicado el método de finalización, el incremento en los niveles de amonio en la rizosfera de plantas sensibles tratadas con glifosato respecto del método de corte (Mijangos *et al.*, 2009) podría explicar por qué la diferencia de abundancia entre métodos es mayor en el caso de AOA que en el caso de BOA.

En lo que respecta a *Actinobacteria* y bacterias totales, la ausencia de diferencias significativas en la abundancia entre ambos métodos de finalización (Tabla 42) es consistente con los resultados obtenidos mediante el análisis metagenómico, donde no se observaron diferencias significativas en ningún filo bacteriano (entre ellos *Actinobacteria*) (Figura 36). En un estudio realizado en tres años diferentes, Barriuso *et al.* (2011) tampoco encontraron modificaciones en la abundancia de *Actinobacteria* en la rizosfera de maíz luego de siete días de haberse aplicado glifosato. Lo mismo observaron para *Acidobacteria* y *Proteobacteria*, en concordancia con los resultados de la Figura 36.

6.5 Secuenciación de amplicones del gen del ARNr 16S

Al explorar niveles taxonómicos inferiores a filo como clase y orden mediante NGS, pudieron evidenciarse diferencias, resaltando nuevamente la importancia de direccionar los análisis también hacia grupos específicos de microorganismos (Anderson, 2003) y no considerar únicamente parámetros integradores de la comunidad como respiración, biomasa microbiana o actividad enzimática. Por ejemplo, a nivel de clase, la mayor abundancia relativa de *Betaproteobacteria* a los 4 días en la rizosfera de plantas tratadas con glifosato respecto de las sometidas a corte (Figura 37) resulta particularmente interesante dado que

también se detectaron diferencias significativas y marginalmente significativas en este grupo microbiano mediante PCR-DGGE a los 10 y 4 días respectivamente (no así a los 17 y 26 días) (Tabla 50).

Uno de los resultados más destacados que se dependen de este análisis es la abundancia significativamente mayor del OTU 35 en el método con glifosato (Figura 40B). Este OTU ha sido identificado en bases de datos del ARNr 16S como una especie del género *Mesorhizobium*, y podría tratarse específicamente de *Mesorhizobium loti* (Tabla 39). *M. loti* es una especie de rizobacteria que posee una notable redundancia de genes codificantes para el catabolismo de fosfonatos, con tres *loci phn* involucrados en este metabolismo a través de la acción de una C-P liasa. Uno de estos *loci* es de codificación cromosómica mientras que los otros dos residen en el plásmido pMLa (Hove-Jensen *et al.*, 2014). Si bien hasta el momento se desconoce la capacidad de *M. loti* de degradar glifosato por medio de la vía de la sarcosina (C-P liasa), el resultado observado sumado a la conocida exudación radical de glifosato hacia la rizosfera (Rodrigues *et al.*, 1982; Kremer *et al.*, 2005) más la redundancia génica para degradar alquil y aminoalquil fosfonatos parecería apoyar dicha capacidad metabólica. Diferentes estudios en plantas sensibles indican que hasta un 15% del glifosato aplicado puede ser translocado a las raíces (Laitinen *et al.*, 2007; Doublet *et al.*, 2009) y que es exudado en diferentes especies de plantas sensibles (Coupland y Caseley, 1975; Rodrigues *et al.*, 1982; Neumann *et al.*, 2006). Por lo tanto, podría esperarse una cantidad significativa de glifosato acumulado en la rizosfera a los 26 días post-tratamiento, tal como fue demostrado en el cultivar sensible de soja W82 (Kremer *et al.*, 2005). Futuros estudios deberán determinar si la especie *M. loti* efectivamente es capaz de degradar glifosato y bajo qué condiciones específicas puede hacerlo. Alternativamente, en caso de no disponer de una C-P liasa capaz de actuar sobre el enlace C-P del glifosato, la potencial participación de *M. loti* en la degradación del glifosato exudado podría ocurrir a nivel de la degradación del AMPA proveniente de la actividad enzimática glifosato oxidasa presente en otras especies de la comunidad. Diferentes cepas bacterianas pueden utilizar el AMPA derivado del glifosato, como fuente de P, a través de C-P liasas que actúan sobre aminoalquilfosfonatos (Hove-Jensen *et al.*, 2014). Como se mencionó antes, la especie *M. loti* posee un set completo de genes suficientes para el catabolismo de alquil- y aminoalquil-fosfonatos, con lo cual el AMPA podría ser potencialmente degradado (Hove-Jensen *et al.*, 2014).

En caso de confirmarse el rol de *M. loti* en la degradación de glifosato, y teniendo en cuenta la abundancia incrementada en la rizosfera de plantas tratadas con el herbicida, será importante determinar si esta capacidad podría ser conferida específicamente por los dos

loci phn presentes en plásmidos pMLa. Hasta el momento no existen evidencias de genes del catabolismo de glifosato codificados de manera extracromosomal. De esta manera, el resultado observado plantea la necesidad de continuar las investigaciones sobre el tema y determinar si la codificación de parte de las enzimas involucradas en la degradación podría transferirse horizontalmente. Por otra parte, en futuros estudios será importante determinar mediante qPCR si existe una mayor abundancia de genes de rizobacterias implicados en la degradación de fosfonatos, entre ellos genes del operón *phn* que codifica para C-P liasas. Como se mencionó en la Introducción General de esta Tesis, las C-P liasas son claves en una de las vías degradativas de glifosato (vía de la sarcosina). En caso de confirmarse un mayor número de copias de estos genes en el método con glifosato respecto del método de corte, se obtendrían más evidencias a favor de un posible enriquecimiento de la rizosfera de *A. sativa* en bacterias degradadoras de glifosato luego del tratamiento con este herbicida.

Otro de los resultados biológicamente relevantes (aunque no significativo estadísticamente), posiblemente relacionado con la exudación de compuestos fenólicos estimulada por el glifosato (propuesta en la sección anterior), fue la mayor abundancia del OTU 15 para el método de finalización con glifosato a los 4 días (Figura 40A). Como indica la Tabla 41, corresponde a *Acidovorax delafieldii*, una especie dentro de la cual se han aislado cepas que poseen la capacidad de degradar una amplia variedad de compuestos del tipo de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) (Samanta *et al.*, 1999; Golubev *et al.*, 2009). La cepa Ph3, por ejemplo, es capaz de utilizar naftaleno, fluoreno, antraceno y fenantreno como única fuente de C y energía, y fue aislada de la rizosfera de *Sorghum bicolor* (Golubev *et al.*, 2009). Por lo tanto, la rizosfera de *A. sativa* podría ser también un hábitat importante de esta especie. De hecho, otra especie del género relacionada, *Acidovorax avenae*, refiere en su nombre al género de plantas del cual ha sido originalmente aislada y descrita esta bacteria fitopatógena (Song *et al.*, 2004). Dado que ciertas enzimas que intervienen en la degradación de HAPs actúan también sobre una amplia gama de compuestos fenólicos, como las enzimas del tipo lacasas (Sharma *et al.*, 2007; Zeng *et al.*, 2011), la mayor abundancia de esta especie podría responder a la utilización de dichos fenoles presentes en los exudados. Ello sería consistente, entonces, con el posible mecanismo indirecto de impacto de glifosato sugerido anteriormente (estimulación de la exudación de fenoles por parte del glifosato).

De la misma manera que el OTU 15, el OTU 1 también mostró una abundancia incrementada en el método con glifosato, a los 4 días (Figura 40A). Para ambos OTUs no se observó significancia estadística pero el tamaño del efecto podría indicar cierta relevancia biológica en relación al estudio en cuestión. La identidad del OTU 1 indica que corresponde

a una especie de *Hydrogenophaga* (Tabla 40), género de la familia *Comamonadaceae* y del orden *Burkholderiales* al igual que *Acidovorax*. Una de las especies candidatas indicadas es *Hydrogenophaga palleroni*, capaz de degradar 4-aminobenzenosulfonato, una amina aromática recalcitrante ampliamente utilizada en la fabricación de pesticidas (Singh *et al.*, 2006). Si bien no hay información disponible sobre su posible presencia en el FC utilizado ni sobre la posible exudación hacia la rizosfera, podría guardar relación con ello y deberá considerarse en futuros estudios. De la misma manera, será importante investigar también si el FC podría contener compuestos fenólicos que puedan acceder a la rizosfera mediante exudación y que expliquen la mayor abundancia de la especie *A. delafieldii* capaz de degradar compuestos relacionados (HAPs).

Al igual que los reportes de DeAngelis *et al.* (2009) en *Avena fatua* L., el filo *Proteobacteria*, reconocido como ampliamente competente en la rizosfera (Philippot *et al.*, 2013), mostró una abundancia relativa notablemente superior a los demás filo en la rizosfera de *A. sativa*. Este resultado es esperable considerando que los principales receptores de los exudados radicales que utilizan los sustratos carbonados allí presentes son miembros del filo *Proteobacteria* tal como ha sido reportado en un estudio con dióxido de carbono marcado con ^{13}C ($^{13}\text{C}\text{-CO}_2$) para marcar los exudados (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2007). En particular, *Alphaproteobacteria* se encuentra muy bien representado normalmente en la rizosfera de diversas especies tal como *A. fatua*, en la cual se ha estudiado en profundidad el microbioma rizosférico en respuesta al crecimiento de las raíces (DeAngelis *et al.*, 2008; DeAngelis *et al.*, 2009). Por lo tanto, la alta abundancia relativa de *Alphaproteobacteria* observada en este estudio en la rizosfera de *A. sativa* es consistente con reportes previos. Al mismo tiempo, señala la importancia de la metagenómica en la caracterización de la rizosfera para especies microbianas difíciles de detectar en medios de cultivo como son algunas de las pertenecientes a la clase *Alphaproteobacteria* (DeAngelis *et al.*, 2008). Los filo microbianos que mostraron la mayor abundancia relativa luego de 67 días de crecimiento (*Proteobacteria* y *Bacteroidetes*) se corresponden con los resultados de un estudio metagenómico en la rizosfera de *A. fatua* donde se ha determinado que la abundancia relativa de *Proteobacteria* y *Bacteroidetes* es estimulada progresivamente a lo largo del crecimiento en relación a otros filo como *Firmicutes*, *Acidobacteria* y *Actinobacteria* cuya abundancia disminuye (Shi *et al.*, 2015).

A diferencia de *Proteobacteria*, los miembros del filo *Actinobacteria* junto con *Acidobacteria* han demostrado una menor participación en la utilización de sustratos carbonados presentes en los exudados radicales. Por lo tanto, ello podría explicar por qué su abundancia en la rizosfera resultó más baja que la de *Proteobacteria* (Vandenkoornhuyse

et al., 2007). El filo *Nitrospirae* presentó una abundancia similar a la de otro filo de reconocida competencia en la rizosfera como *Acidobacteria*. Esta observación es consistente con los resultados obtenidos en *A. fatua*, una de las especies de plantas donde se ha reportado una buena competencia de *Nitrospirae* en rizosfera (DeAngelis *et al.*, 2009). Por su parte, el filo *Verrucomicrobia* se observó en una muy baja abundancia, aun cuando los cebadores utilizados han sido diseñados para evitar sesgos que excluyan y conduzcan a la subestimación de este filo (Bergmann *et al.*, 2011). La escasa representatividad de *Verrucomicrobia* en el metagenoma de la rizosfera de *A. sativa* es consistente con otros trabajos en donde ha sido observado en baja abundancia en la rizosfera (Li *et al.*, 2016).

Las diferencias no significativas en la abundancia del filo *Acidobacteria* (Figura 35) constituyen un resultado atípico en la rizosfera de *A. sativa* si se tiene en cuenta que en estudios recientes realizados en rizosfera de soja RR y de maíz mediante NGS, se han reportado consistentemente disminuciones en la abundancia respecto de plantas control sin glifosato (Newman *et al.*, 2016a) como así también en suelo no rizosférico al comparar una línea GR contra una casi isogénica sensible a glifosato (Babujia *et al.*, 2016). Las acidobacterias constituyen un grupo importante en suelo rizosférico (Lee *et al.*, 2008) y están ampliamente involucradas en procesos biogeoquímicos como la degradación de la celulosa (Newman *et al.*, 2016a).

A nivel de clases bacterianas, la mayor abundancia de *Bacilli* y del orden *Bacillales* en la rizosfera de plantas tratadas con glifosato se explicaría por un incremento de la abundancia de estos grupos bacterianos hacia los 26 días, más que por una reducción de su abundancia en la rizosfera de plantas cortadas durante ese período de tiempo. Esto se aprecia claramente al realizar la comparación entre ambas fechas dentro de cada método de finalización (Anexo IV, Figuras 56B y 57B).

La mayor abundancia del orden *Burkholderiales* en el método con glifosato a los 4 días (Figura 37A) es consistente con la mayor abundancia de *Betaproteobacteria* en esa misma fecha (Figura 38A), indicando que la diferencia observada para esta clase bacteriana dentro de *Proteobacteria* podría resultar posiblemente del orden *Burkholderiales* (perteneciente a *Betaproteobacteria*). Si bien la diferencia de abundancia del orden *Burkholderiales* no es significativa entre ambos métodos de finalización, podría ser biológicamente relevante. En otros estudios se han observado modificaciones similares en la abundancia de los grupos mencionados. Por ejemplo, en estudios en microcosmos, Lancaster *et al.* (2010) reportaron un incremento en la abundancia de *Proteobacteria* frente a aplicaciones repetidas de un formulado comercial de glifosato. El incremento se observó tanto para una como para cinco aplicaciones respecto del control. Al estudiar detalladamente estos cambios en la

abundancia a niveles taxonómicos inferiores, se determinó que los incrementos se correspondían con *Betaproteobacteria* y más específicamente con el orden *Burkholderiales*. La mayor abundancia de este grupo microbiano frente a glifosato podría estar relacionada con la misma tendencia observada para especies de *Pseudomonas* de estudios anteriores (Quinn *et al.*, 1988; Gimsing *et al.*, 2004; Ratcliff *et al.*, 2006), dado que la taxonomía del género ha sido revisada y se ha determinado que ciertas especies que fueron previamente identificadas como *Pseudomonas* pertenecen en la actualidad a *Burkholderia* (Anzai *et al.*, 2000; Estrada-de los Santos *et al.*, 2015).

El orden *Burkholderiales* comprende especies bacterianas con diversas capacidades, entre ellas el control biológico de patógenos, la degradación de xenobióticos y la promoción del crecimiento (Estrada-de los Santos *et al.*, 2015) incluyendo dentro de esta última la fijación del nitrógeno (Estrada-de los Santos *et al.*, 2001). Las diferencias entre métodos fueron mayores a los 4 días que a los 26 días, según lo indicaron las estadísticas de tamaño del efecto. Es decir, se evidencia un carácter transitorio de estas diferencias. Por lo tanto, si bien la abundancia incrementada de *Burkholderiales* en el método con glifosato podría ser una característica ecológicamente relevante en función de sus capacidades metabólicas, la naturaleza transitoria de esta diferencia respecto del método de corte limita su relevancia biológica en la rizosfera (al menos en lo que refiere a los posibles beneficios para la planta). En cambio, la tendencia observada para el orden *Bacillales*, y para la familia *Bacillaceae* en particular, podría ser biológicamente más importante que el caso anterior dado que la diferencia no se presenta al inicio (4 días) pero sí al final (26 días). Deberá determinarse si la abundancia incrementada del orden *Bacillales* en el método con glifosato podría estar relacionada con la capacidad de degradar el glifosato presente en los exudados. En ciertas especies de este grupo se ha reportado la degradación de enlaces C-P presentes en fosfonatos no sólo por medio de la vía de la C-P liasa (Quinn *et al.*, 1989), sino también por medio de una fosfonatasa (2-fosfonoactaldehído hidrolasa) (Kononova y Nesmeyanova, 2002). En el primer caso, la vía se estudió en *Bacillus megaterium* (capaz de degradar 15 fosfonatos diferentes incluyendo glifosato), mientras que en el segundo caso se estudió en *Bacillus cereus* (Kononova y Nesmeyanova, 2002). Asimismo, las especies del género *Bacillus* junto con otros géneros como *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Burkholderia* y *Pseudomonas* se encuentran dentro los microorganismos más importantes capaces de solubilizar el P (*Phosphate Solubilizing Bacteria* o *PSB*), lo cual constituye uno de los múltiples mecanismos de promoción del crecimiento en plantas (Ahemat y Kibret, 2014). Futuras investigaciones deberán determinar si existe un enriquecimiento en determinadas

rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR) en la rizosfera de plantas tratadas con glifosato.

En el caso de *Bradyrhizobiaceae* se observó una diferencia estadísticamente significativa entre ambos métodos (abundancia incrementada en el método con glifosato) a los 26 días. Si bien el tamaño del efecto no superó el mínimo establecido (Figura 39B), deberá estudiarse este resultado dada la importancia que tienen las especies de esta familia a nivel de la rizosfera como así también debido a la redundancia génica para degradar fosfonatos de *Bradyrhizobium japonicum* (similar a *M. loti*; Hove-Jensen *et al.*, 2014), la especie más estudiada de esta familia. *B. japonicum* posee dos loci *phn*, donde cada uno de ellos codifica un set completo de polipéptidos requeridos para la vía C-P liasa de degradación de fosfonatos. Los resultados aquí observados contrastan con trabajos que indican una inhibición parcial o completa de *B. japonicum* por glifosato en medios de cultivo (Zablotowicz y Reddy, 2004) pero son consistentes con Arango *et al.* (2014) quienes no observaron tal inhibición a nivel de la rizosfera en soja GR para la dosis recomendada mediante un método independiente de cultivo (análisis de T-RFs). Estudios de metagenómica recientes mediante la estrategia MWAS (*Metagenomic Wide Association Studies*) indican que la productividad de los suelos explica la mayor parte de la variación taxonómica en el microbioma de los mismos, y determinaron que *Bradyrhizobium* y *Gammaproteobacteria* presentaban valores de abundancia significativamente mayores en suelos de alta productividad (asociación estadísticamente significativa) (Chang *et al.*, 2017). Por lo tanto, la mayor abundancia de *Bradyrhizobiaceae* en el método con glifosato podría ser biológicamente relevante en vistas de su contribución a la productividad de los suelos. De la misma manera, el hecho de que *Gammaproteobacteria* sea la clase bacteriana más abundante a los 26 días y que su abundancia no sea menor que la que se observa en el método de corte (Figura 37B) puede ser considerado como otro resultado interesante e cuanto a su implicancia para la productividad.

Contrariamente a la diversidad funcional, donde se observaron diferencias entre corte y glifosato a los 26 días, para la diversidad alfa de las comunidades bacterianas no se observaron diferencias: la riqueza y la equitatividad no mostraron diferencias entre los métodos de finalización en ninguna de las dos fechas analizadas (Tabla 34). Incluso los dos índices de heterogeneidad analizados (de tipo I y II), con diferente sensibilidad a las especies más y menos abundantes, tampoco mostraron un efecto significativo del método de finalización (Tabla 34). En relación a ello, es importante destacar que el análisis fisiológico mediante medidas de respiración no sólo involucra a comunidades bacterianas sino también a otros componentes de la microbiota (levaduras, hongos filamentosos y

protozoos, por ejemplo). En cambio, la diversidad estudiada mediante secuenciación de amplicones del gen del ARNr 16S corresponde a la diversidad bacteriana únicamente. Los perfiles fisiológicos obtenidos no son específicos para bacterias y por lo tanto no se espera necesariamente la misma tendencia para la diversidad catabólica y para la diversidad bacteriana (OTUs). Las diferencias no significativas en la diversidad alfa son consistentes con los resultados de secuenciación de amplicones del ARNr 16S reportados recientemente por Newman *et al.* (2016a) en soja y maíz resistentes a glifosato luego del tratamiento con el herbicida. En dicho trabajo no se observaron diferencias tampoco en el índice H', en el número de OTUs observados en la rizosfera de plantas tratadas con glifosato y de plantas control como así tampoco en el índice de Chao-1. Arango *et al.* (2014), en cambio, reportaron un incremento en la diversidad determinada mediante análisis de T-RFs en soja RR respecto de un control sin glifosato.

Los valores del índice de equitatividad E_H cercanos a 1 (aproximadamente 0,9) en las 12 muestras indican una alta equitatividad, es decir, una abundancia relativa similar para los distintos OTUs.

De la misma manera que para la diversidad alfa, para la diversidad beta tampoco se observó un efecto significativo del factor método. En términos generales, la variación de la comunidad bacteriana estuvo más relacionada con la dinámica temporal (fecha de muestreo) que con el método de finalización. A esta misma conclusión arribaron Arango *et al.* (2014) al analizar los perfiles multivariados de fragmentos terminales de restricción en la rizosfera de plantas de soja GR con y sin aplicación de glifosato. De manera similar, en plantas resistentes a glifosato, Newman *et al.* (2016a) tampoco observaron efectos del tratamiento al comparar la rizosfera de plantas control y tratadas con glifosato. En cambio, sólo la especie vegetal (soja/maíz) tuvo un efecto significativo. Considerando la detección de diferencias en grupos específicos pero no a nivel de diversidad de toda la comunidad bacteriana, Newman *et al.* (2016a) concluyeron que es necesario analizar la respuesta de la comunidad a niveles más bajos taxonómicamente y a nivel funcional. La misma conclusión puede establecerse a partir de los resultados del presente trabajo donde no se observaron diferencias en la diversidad alfa y beta pero sí en grupos taxonómicos específicos y también en la diversidad funcional (perfiles catabólicos), tal como se ha discutido en párrafos anteriores.

Si bien hasta el momento se han comparado los resultados de este estudio con resultados observados en tratamientos con y sin glifosato de investigaciones previas, se ha evitado sobre-interpretar y extrapolar conclusiones en relación a la microbiota rizosférica, aun cuando existan similitudes, debido fundamentalmente a que se trata de especies de

plantas diferentes. Como se mencionó en la Introducción General de la Tesis, las plantas pueden modular la composición y la actividad de las comunidades microbianas de la rizosfera (Smalla *et al.*, 2001; Kowalchuk *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2006; Haichar *et al.*, 2008; Hartmann *et al.*, 2009). Las diferencias en la cantidad y tipo de rizodepósitos, como así también las diferencias en la morfología de la raíz entre diferentes especies vegetales contribuyen a los efectos rizosféricos especie-específicos. A ello se suman las diferencias inherentes al tipo de suelo utilizado en cada experimento y a la historia de cada uno de ellos. Todos estos factores modulan la estructura y función de las comunidades microbianas de la rizosfera (Berg y Smalla, 2006; Philipott *et al.*, 2013). La observación de diferentes resultados debido a diferencias en el tipo de suelo, incluyendo la textura, mineralogía, pH y materia orgánica, ya ha sido planteada también en estudios previos como un aspecto importante a considerar (Newman *et al.*, 2016a; Rascovan *et al.*, 2016; Chang *et al.*, 2017), reconociéndose el carácter específico de cada tipo de suelo en particular al momento de establecer comparaciones. Específicamente, como ya se ha mencionado en capítulos anteriores, la adsorción y la degradación biótica del glifosato juegan un rol central en la biodisponibilidad del herbicida en cada suelo (Zabaloy *et al.*, 2011). Ambas propiedades pueden variar dependiendo del tipo de suelo (Duke *et al.*, 2012). Por otro parte, debe tenerse en cuenta que muchos de los estudios sobre impacto de glifosato se han llevado a cabo en cultivos GR y no en cultivos sensibles como *A. sativa*. Desde el punto de vista bioquímico, podrían existir diferencias en las cantidades de glifosato en los exudados si se tiene en cuenta que la mayor parte del glifosato aplicado a cultivos GR será translocado y no actuará sobre la enzima EPSPS. Dado que muy poco glifosato se degrada en la planta (Kremer *et al.*, 2005), sería esperable encontrar mayores cantidades en los exudados de plantas GR que en los de plantas sensibles para una misma dosis.

Por último, cabe destacar que sólo se consideraron en el análisis metagenómico los datos correspondientes al dominio Bacteria. Tal como se indicó en la Sección 5.2.1, los cebadores universales para procariotas, entre ellos el par utilizado (515F-806R), no son los más apropiados para el estudio de arqueas dada su limitada capacidad de capturar la diversidad de estos microorganismos. Para estudiar adecuadamente su diversidad se requieren pares de cebadores específicos en lugar de cebadores universales (Raymann *et al.*, 2017). La omisión de secuencias de Arquea al utilizar el par de cebadores 515F-806R también ha sido recientemente reportada por Eloe-Fadrosch *et al.* (2016). Otros estudios de secuenciación de amplicones del gen del ARNr 16S con el par 515F-806R tampoco han considerado el análisis de secuencias de arqueas en muestras de suelo (Fierer *et al.* 2012; Newman *et al.* 2016a).

6.6 *Análisis molecular de elementos genéticos móviles*

La transferencia horizontal de genes (THG) por medio EGMs posee un rol clave en la adaptación y robustez de las comunidades microbianas a ambientes cambiantes o a nuevos desafíos y oportunidades ambientales (Heuer y Smalla, 2012). Como se comentó en la Introducción General de esta Tesis, la evolución rápida es una de las características de las poblaciones microbianas que contribuyen a la resistencia y a la resiliencia frente a distintos tipos de perturbaciones, por ejemplo, frente a pesticidas. Los estreses pueden proveer una presión de selección que conduzca a la diversificación (Cohan, 2002). Esto es posible debido a que los microorganismos se caracterizan por su rápido crecimiento, altas densidades poblacionales, altas tasas de mutación y son capaces de recombinación a través de la THG. La THG podría ser particularmente importante en ambientes contaminados en donde se ha observado un enriquecimiento en determinados plásmidos que confieren resistencia a dichos contaminantes (Dunon *et al.* 2013; Jechalke *et al.*, 2013; Dealtry *et al.*, 2014). Al mismo tiempo, no debe perderse de vista que la THG, además de influenciar la estructura y función de las comunidades microbianas en ambientes naturales como el suelo, tiene una influencia importante para la salud humana (Wright, 2010). Por ejemplo, permitiendo que microorganismos potencialmente patógenos de origen edáfico desarrollen resistencia a antibióticos por medio de EGMs, como los plásmidos promiscuos IncP-1. De hecho, estos fueron aislados originalmente de cepas hospitalarias y se los asoció al ambiente clínico, pero luego se determinó que son ubicuos en el suelo, lodos activados y enmiendas (Smalla *et al.*, 2000; 2006; Heuer *et al.*, 2002; Bahl *et al.*, 2009). Actualmente se ha determinado que la microbiota ambiental, incluso en ambientes no expuestos a antibióticos, posee un gran número y diversidad de genes de resistencia a los mismos, en muchos casos muy similares a los encontrados en bacterias patógenas (Aminov *et al.*, 2009). En particular, la rizosfera constituye un *hot spot* para la THG (Heuer y Smalla, 2012), contribuyendo a la diseminación de determinantes génicos de resistencia a antibióticos (Nesme y Simonet, 2015).

Como se mencionó anteriormente, además de sus implicancias en la salud, el impacto de ciertas prácticas sobre EGMs podría tener efectos sobre las propias comunidades microbianas en donde desempeñan un rol adaptativo importante. En particular, se ha propuesto que, a las concentraciones sub-inhibitorias normalmente encontradas en el suelo, los antibióticos tendrían un rol modulador de la expresión génica y de señalización (Aminov *et al.*, 2009; Heuer y Smalla, 2012). Por lo tanto, el impacto sobre ciertos plásmidos que portan genes de resistencia a antibióticos, como el observado en este estudio sobre

CAPÍTULO 4

plásmidos IncP-1, podría influir indirectamente en el funcionamiento de las comunidades microbianas.

La detección de plásmidos IncP-1 ϵ únicamente en la rizosfera de plantas tratadas con glifosato a los 26 días posee una particular importancia debido a que los plásmidos de este subgrupo constituyen importantes vectores para la transferencia horizontal de genes de resistencia en agroecosistemas (Heuer *et al.*, 2012). En el estudio realizado por Heuer *et al.* (2012) se encontró una mayor abundancia de plásmidos IncP-1 ϵ en microcosmos de un suelo agrícola tratado con enmienda que contenía el antibiótico sulfadiazina respecto del control tratado sólo con agua. Esto indicó un enriquecimiento de bacterias con resistencia al antibiótico en dicho suelo. Al mismo tiempo, se caracterizaron 50 plásmidos IncP-1 ϵ que habían sido capturados en experimentos previos tanto en microcosmos y mesocosmos como así también en estudios a campo (suelos agrícolas). Todos estos plásmidos contenían diversos genes de resistencia a antibióticos. Considerando la notable diversidad de casetes con genes de resistencia a antibióticos detectados en estos plásmidos IncP-1 ϵ , como así también la capacidad de transferirse de manera eficiente bajo condiciones naturales del suelo y el amplio rango de hospedador, se propuso que los plásmidos IncP-1 ϵ serían importantes vectores de dispersión de genes de resistencia en agroecosistemas (Heuer *et al.*, 2012).

Por su parte, los plásmidos IncP-1 β también fueron detectados únicamente en la rizosfera de plantas tratadas con glifosato, aunque en este caso, a diferencia de los plásmidos IncP-1 ϵ , la observación se registró a los 10 días y no a los 26 días. Es decir, la tendencia es la misma pero la fecha en la cual se observa es diferente. Estas diferencias temporales podrían estar relacionadas con las diferentes funciones aportadas por cada subgrupo a los hospedadores. Particularmente, para los plásmidos IncP-1 β , se han descrito muchos genes catabólicos en contraste con los plásmidos IncP-1 ϵ que portan casetes de resistencia a antibióticos (Heuer *et al.*, 2012).

La detección de plásmidos IncP-1 ϵ a los 26 días en la rizosfera de plantas tratadas con glifosato respecto de plantas finalizadas por corte podría responder a una mayor rizodeposición luego de ese período, tanto por la exudación incrementada de carbohidratos y aminoácidos (Kremer *et al.*, 2005) como por la deposición de materia orgánica resultante de la necrosis del tejido radicular senescente. Esta rizodeposición incrementada conduciría a una mayor disponibilidad de sustratos generando una condición favorable para la conjugación bacteriana. La THG por conjugación requiere de una alta densidad celular (para incrementar la probabilidad de contacto y formación de la estructura de apareamiento) como así también de una alta actividad metabólica de los miembros involucrados dado que es un

proceso energéticamente demandante (van Elsas *et al.*, 2003). Estas dos condiciones serían favorecidas por una rizodeposición incrementada. Asimismo, una mayor disponibilidad de nutrientes favorece la proliferación de los transconjugantes (Heuer y Smalla, 2012). Mølbak *et al.* (2007) demostraron que una mayor exudación (influyendo sobre la densidad celular) y una menor tasa de crecimiento de la raíz (influyendo sobre la distribución de las células) son los dos factores que promueven las frecuencias de transferencia de plásmidos en la rizosfera. Dado que el glifosato puede estimular la exudación (Kremer *et al.*, 2005) y al mismo tiempo inhibir el crecimiento de la raíz (Imparato *et al.*, 2016), podría incrementar las frecuencias de transferencia en la rizosfera. Sin embargo, serán necesarios más estudios para determinar si existen mayores frecuencias de transferencia o si se explica por una mayor abundancia de dadores de estos plásmidos.

En lo que respecta a integrones de clase I, no se observaron diferencias entre ambos métodos de finalización y sólo fueron detectados a partir de los 17 días (Figura 48). Esto indica que el método de finalización no ejerce efectos diferenciales sobre este tipo de EGMs en la rizosfera y que tanto la rizodeposición de plantas cortadas como de plantas secadas con glifosato conducen a un incremento de la abundancia hacia fechas más tardías. Deberá determinarse en próximos estudios qué modificaciones puntuales de los rizodepósitos ocurren a partir de los 17 días que puedan explicar esta observación. Los integrones de clase I pueden considerarse indicadores indirectos de impacto de pesticidas teniendo en cuenta que están asociados a una gran diversidad de genes de resistencia a antibióticos. Dado que la resistencia a antibióticos en comunidades microbianas implica una ventaja competitiva para las células que portan los genes accesorios responsables, las diferencias en la abundancia de integrones de clase I frente a ciertos contaminantes podrían reflejar diferentes presiones de selección en la comunidad (Gillings *et al.*, 2014). Desde este punto de vista, las diferencias no significativas en la abundancia de *Actinobacteria*, que incluye a prolíficos productores de antibióticos, sería consistente con las diferencias no significativas en la abundancia relativa de integrones de clase I (Figura 48).

Como se mencionó anteriormente, no existen reportes previos donde se hayan evaluado los efectos de un tratamiento con glifosato sobre plásmidos de amplio rango de hospedador (ej.: plásmidos IncP-1) o sobre integrones de clase I, aun cuando se ha determinado que la exposición prolongada a ciertos pesticidas conduce a un enriquecimiento en estos EGMs (Dealtry *et al.*, 2014). Debe tenerse en cuenta que hasta el momento el impacto del herbicida (IA o FC) en plásmidos de amplio rango de hospedador y en integrones no había sido considerado en ningún estudio y menos aún a nivel de la rizosfera. En un estudio anterior se abordaron los efectos de la fertilización fosforada y de glifosato sobre las

frecuencias de transformación bacteriana en *Acinetobacter baylyi* pero no sobre la detección de plásmidos de amplio rango de hospedador o de integrones (Watson y Carter, 2008). Si bien se ha determinado mediante análisis metagenómico una abundancia incrementada de secuencias génicas de fagos, profagos, elementos transponibles y plásmidos en la rizosfera de un cultivar de soja RR respecto de una línea casi isogénica (Babujia *et al.*, 2016), no se han hallado reportes sobre efectos de glifosato en plásmidos IncP-1 y en integrones de clase I. Teniendo en cuenta la importancia para la adaptación de las comunidades microbianas como así también su implicancia a nivel de salud humana, y considerando que estos EGMs ya han sido propuestos como indicadores frente a diversos xenobióticos, los resultados aquí presentados revisten una especial relevancia, y se plantea la necesidad de continuar profundizando el conocimiento sobre el tema. Asimismo, los resultados ponen de manifiesto la necesidad de comenzar a considerar a estos indicadores moleculares en las evaluaciones de impacto de glifosato en diversos ambientes. Las evaluaciones de impacto deben hacerse cada vez más rigurosas incluyendo indicadores que brinden información sobre posibles efectos a largo plazo en el ecosistema. En este sentido, y teniendo en cuenta el rol del hombre en los agroecosistemas, los indicadores que se relacionen tanto con la adaptación y diversificación de las comunidades microbianas del suelo como así también con las implicancias a nivel de salud humana despiertan un interés particular a largo plazo. Sin duda, los EGMs del suelo, un ambiente donde residen muchos microorganismos potencialmente patógenos para el humano, se presentan como claves en evaluaciones de impacto.

6.7 Comparación de resultados obtenidos en diferentes fechas de muestreo mediante múltiples metodologías de estudio

La comparación de los resultados obtenidos mediante CLPP, *metabarcoding* (diversidad beta) y PCR-Southern blot (detección de plásmidos IncP-1) señala una clara tendencia en común para todos ellos que ya fue mencionada anteriormente: sólo las muestras provenientes de plantas tratadas con glifosato parecen asemejarse a su condición más temprana post-tratamiento (4 días) luego de 26 días. Ello no ocurre en el método de corte. El ordenamiento de los perfiles fisiológicos (Figura 25), refleja más claramente esa tendencia: las muestras del tratamiento con glifosato a los 26 días (G.26D) no sólo se ordenan más próximas a las muestras con glifosato a los 4 días (G.4D) sino también a las muestras del método de corte de esa fecha inicial (C.4D). Si se observa el ordenamiento de los perfiles en fechas intermedias (10 y 17 días) se aprecia una separación respecto de la fecha inicial. No obstante, a los 26 días las muestras del método con glifosato (G.26D) se encuentran muy cercanas a G.4D y menos a C.4D, mientras que las del método de corte (C.26D)

permanecen completamente separadas. Si se considera como referencia al tratamiento corte a los 4 días (la fecha más cercana al momento pre-tratamiento), los resultados indicarían entonces un carácter transitorio de las modificaciones en respuesta a la aplicación de glifosato, pero no en respuesta al método de corte. En otras palabras, las modificaciones que se observan frente a glifosato en fechas intermedias (respecto de 4 días) tienden a disiparse a los 26 días, mientras que con el método de corte continúan presentándose a los 26 días de aplicado el tratamiento. No obstante, no es posible referirse estrictamente a ello en términos de resiliencia de la comunidad dado que no se realizaron mediciones exactamente en el tiempo cero, justo antes de la aplicación del método de finalización. A nivel de presencia/ausencia de plásmidos IncP-1, la tendencia mencionada se refleja claramente en los resultados de la Figura 46: los plásmidos IncP-1 ϵ se detectan tanto al inicio como al final en el método con glifosato; en cambio, para el método de corte la detección de plásmidos difiere al inicio y al final, detectándose a los 4 días pero no a los 26 días. En los parámetros de diversidad catabólica (Figura 28) se observa también esta tendencia: en el método con glifosato disminuyen respecto de la fecha inicial pero se restablecen a los 26 días (no se observan diferencias significativas entre 4 y 26 días), mientras que en el método de corte no recuperan el valor observado inicialmente. Finalmente, en el ordenamiento de la Figura 32 (diversidad beta) y en el análisis de agrupamientos de la Figura 33 se repite la tendencia: las muestras del método con glifosato a los 26 días (G.26D) se encuentran más próximas a las correspondientes a 4 días, en comparación con las muestras del método de corte (C.26D).

Otra tendencia que se desprende de la comparación de los resultados de diversas metodologías de estudio de comunidades microbianas y de plásmidos IncP-1 es la detección de múltiples diferencias entre métodos de finalización a los 26 días. En esta fecha de muestreo se observa: **1)** separación de perfiles fisiológicos en el ordenamiento mediante ACP confirmada en el test ANOSIM (Figura 25; Tabla 25); **2)** mayor diversidad catabólica en el método con glifosato respecto del método de corte (Figura 28); **3)** disminución en la abundancia de AOA (Figura 41) **4)** mayor intensidad de la señal de hibridación de plásmidos IncP-1 en muestras del método con glifosato (Figura 44); **5)** presencia de plásmidos IncP-1 ϵ en el método con glifosato y ausencia en el método de corte (Figura 46). Como ya se ha mencionado anteriormente, las diferencias en esta fecha en particular respecto de fechas anteriores podrían responder a mayores cantidades de glifosato acumulado en la rizosfera como consecuencia de la exudación durante ese período de tiempo. Si bien esto no ha sido estudiado en *A. sativa*, se ha determinado que en el cultivar de soja W82 sensible al herbicida la cantidad acumulada en el exudado por planta a los 16 días es 4,6 veces mayor

a la detectada inicialmente a los dos días (Kremer *et al.*, 2005). Si la exudación fuera similar en *A. sativa*, las observaciones enumeradas previamente serían entonces consistentes con una acumulación progresiva en la rizosfera. En virtud de los diferentes resultados obtenidos en este estudio, el análisis químico cuantitativo de glifosato y de ciertos compuestos químicos (entre ellos, compuestos fenólicos, como se mencionó en la Sección 6.3) en los exudados brindará información importante al respecto.

Tomando en consideración las tendencias temporales mencionadas anteriormente al comparar ambos métodos de finalización, podría esperarse una mayor probabilidad de encontrar efectos diferenciales sobre el cultivo de cosecha sucesor sembrado a los 26 días de aplicado el tratamiento que inmediatamente después del mismo (4 días). No obstante, también podrían observarse efectos diferenciales para períodos más cortos como 10 días, donde se observó, por ejemplo, una diferencia en la estructura de la comunidad de betaproteobacterias y en la presencia/ausencia de plásmidos IncP-1 β . De hecho, no se estudió la diversidad microbiana ni diferencias en la abundancia de grupos taxonómicos específicos a los 10 y 17 días. Por lo tanto, podrían existir diferencias entre ambos métodos en dichos momentos que influyan diferencialmente en el cultivo de cosecha sembrado. Como se mencionó en la introducción de este capítulo, los estudios relacionados con posibles efectos de tratamientos con glifosato sobre cultivos sembrados con posterioridad al CC son escasos. Es necesario continuar con ellos dadas las implicancias agronómicas asociadas a estas prácticas. Tesfamariam *et al.* (2009), por ejemplo, reportaron efectos de inhibición del crecimiento en plantas de girasol sembradas inmediatamente después de aplicado un formulado comercial de glifosato sobre *L. perenne* crecida en el mismo suelo. La comparación se llevó a cabo frente a controles de *L. perenne* donde se aplicó un corte de la parte aérea en lugar de secado con glifosato.

En el caso particular de este estudio con *A. sativa*, la menor abundancia de AOA observada a los 26 días en el método de finalización con glifosato podría implicar una actividad nitrificante reducida y menores concentraciones de nitrato para el cultivo sucesor. Deberán realizarse estudios a nivel funcional para demostrarlo (ej.: potencial de nitrificación y dinámica de N-NO_3^- extractable, Zabaloy *et al.*, 2017). Las implicancias de una reducción en los niveles de nitrato como consecuencia de una inhibición de la nitrificación (por modificación de los exudados) podrían ser particularmente importantes en suelos agrícolas como el utilizado en este estudio. De acuerdo con Subbarao *et al.* (2015), reducir la actividad nitrificante mediante inhibidores biológicos de la nitrificación (IBNs) mejoraría la eficiencia de uso de nitrógeno en plantas al mejorar la captación y retención del N, reduciendo las pérdidas asociadas a los procesos de nitrificación-denitrificación. Esto se

explica considerando que tanto el amonio como nitrato pueden ser utilizados como fuentes inorgánicas de nitrógeno por plantas y microorganismos, por lo tanto, inhibir la actividad nitrificante del suelo no necesariamente limitaría la disponibilidad de N para el crecimiento vegetal o la actividad microbiana. Desde este punto de vista, un posible impacto sobre el proceso de nitrificación (inhibición) en raíces remanentes de *A. sativa* luego de su secado de con glifosato, podría no implicar necesariamente efectos negativos en plantas sucesoras, sino más bien, una mayor disponibilidad de N. Debe tenerse en cuenta que una de las principales diferencias entre los ecosistemas no disturbados y los sistemas de intensificación agrícola actuales radica en que estos últimos se caracterizan por ser extremadamente sensibles a pérdidas de N e inherentemente ineficientes en el ciclo del N. El nitrato producto de la alta actividad nitrificante es propenso a la lixiviación y a la denitrificación en suelos bajo agricultura intensiva.

6.8 Aspectos pendientes de estudio y consideraciones finales

Una aspecto importante que deberá estudiarse y que ya ha sido propuesto por otros investigadores (Bott *et al.*, 2011) son las alteraciones químicas inducidas por las raíces en la rizosfera (por ejemplo para la adquisición de formas solubles de P o Fe), las cuales podrían contribuir a la re-movilización del glifosato adsorbido en el suelo, para aquellos suelos con una larga historia de exposición al herbicida. Como se indicó en la Introducción de la Tesis, existe la posibilidad de desorción y movilidad del glifosato en el suelo ante diferentes condiciones (Vereecken, 2005). En este estudio en particular con *A. sativa*, el suelo utilizado fue un suelo expuesto durante varios años al herbicida como se indicó en el Capítulo 1. Por lo tanto, si el glifosato puede modificar la cantidad y la composición química de los exudados (Duke *et al.*, 2012), podría existir una diferencia en capacidad de re-movilización de glifosato entre plantas cortadas o secadas con glifosato. En última instancia, en caso de que los exudados de plantas tratadas con glifosato re-movilizaran el glifosato naturalmente adsorbido en el suelo, más el propio glifosato que es directamente exudado (Kremer *et al.*, 2005), podrían tener una influencia importante en la microbiota de la rizosfera.

Los resultados presentados previamente permitieron cumplir con el objetivo propuesto: determinar si las comunidades microbianas de la rizosfera de plantas sometidas al método de finalización con glifosato difieren del método de corte y en qué medida, de manera de predecir cómo podrían influir estas comunidades en las propiedades del suelo y en cultivos sucesores. Asimismo, permitieron confirmar la hipótesis propuesta originalmente acerca de la existencia de diferencias en las comunidades microbianas. Muchas de esas diferencias observadas serían atribuibles a diferencias en los exudados radicales de plantas sometidas

a uno u otro método, debido a la reconocida influencia de los compuestos químicos presentes en ellos sobre la estructura de las comunidades microbianas (Philipott *et al.*, 2013; Badri y Vivanco, 2009). La exudación directa de glifosato (Kremer *et al.*, 2005) y la modificación de la calidad y cantidad de los exudados inducida por este compuesto (exudación incrementada de aminoácidos y carbohidratos, Kremer *et al.*, 2005) jugarían un rol central en las diferencias de los rizodepósitos entre ambos métodos de finalización, aunque estrictamente las diferencias en los mismos podrían explicarse no sólo por la presencia/ausencia del herbicida en uno y otro método de finalización. La composición de los rizodepósitos podría diferir también producto de la eliminación de la parte aérea de la planta. Por lo tanto, es necesaria cierta cautela al establecer conclusiones sobre causalidad del herbicida en este estudio: las evidencias provistas no son suficientes para asignar causalidad únicamente al glifosato y/o a los adyuvantes contenidos en el formulado comercial, aun cuando sugieren una contribución consistente a las diferencias observadas.

Más allá de esta última aclaración, los resultados de otros estudios indican que la defoliación o el corte de la planta no tienen efectos sobre comunidades microbianas rizosféricas respecto de plantas sin ningún tipo de tratamiento, apoyando una contribución importante del herbicida a las diferencias observadas entre corte y secado con glifosato. Por ejemplo, no se encontraron modificaciones en la respiración microbiana en *Phleum pratense* L. (Ilmarinen *et al.*, 2008) ni en la estructura de la comunidad bacteriana en *Trifolium repens* L. y en *Lolium perenne* L. (Clayton *et al.*, 2005). Imparato *et al.* (2016) tampoco encontraron diferencias significativas en la estructura de la comunidad bacteriana rizosférica de cebada entre plantas cortadas o sin tratamiento al realizar un ACP considerando diferentes variables microbiológicas (recuento de bacterias de crecimiento rápido y lento, número más probable de protistas, número de copias del gen del ARNr 16S y número de bandas en perfiles de DGGE de bacterias totales). Es importante destacar también, ante todo, que un tratamiento control sin corte no representa de ningún modo una situación real en lo referido a un CC (el cultivo debe ser finalizado) y por ello mismo tampoco fue considerado.

Finalmente, es importante realizar dos aclaraciones. Por un lado debe tenerse en cuenta que hasta aquí se han considerado a los exudados radicales de plantas tratadas con el herbicida como la única fuente de glifosato a la que se ven expuestas directamente las comunidades microbianas de la rizosfera. Esto se debe a que el glifosato puede ser exudado a la rizosfera y la exposición resultante sería mayor por este medio en relación a otros mecanismos. En el tiempo del ensayo sería esperable una mayor exposición de las comunidades por exudación directa que por movilización del glifosato desde la superficie o bien a partir del desprendimiento de tejidos vegetales en descomposición. Sin embargo,

debe tenerse en cuenta siempre que los residuos vegetales pueden constituir también un reservorio de glifosato, donde la protección que brinda el tejido vegetal puede aumentar notablemente la persistencia del glifosato respecto de aquella fracción que accede a la superficie del suelo cuando éste se encuentra desnudo (Mamy *et al.*, 2016; Cassigneul *et al.*, 2016).

Por otro lado, la segunda aclaración que es importante mencionar se encuentra relacionada con el alcance del estudio realizado en términos de prácticas agronómicas que emplean formulados comerciales de glifosato como herbicida, más allá del empleo como desecante de CC. El desarrollo original del herbicida para combatir un gran número de malezas debido a su amplio espectro plantea el interrogante de qué ocurre específicamente en la rizosfera de aquellas malezas más comúnmente encontradas en la región Pampeana y que en muchos casos requieren altas dosis de glifosato para su eliminación debido a la resistencia desarrollada. Sin duda, existen muchos aspectos a investigar al respecto y que deberán abordarse específicamente para cada maleza en particular y en cada tipo de suelo en el que se desarrollan dichas malezas. Numerosos estudios han demostrado que existen efectos del tipo “especie específicos” de las plantas sobre la composición y la abundancia relativa de poblaciones microbianas de la rizosfera (tanto de cultivos como de especies de plantas nativas) (Smalla *et al.*, 2001; Costa *et al.*, 2006; Garbeva *et al.*, 2008; Dias *et al.*, 2012). Se ha determinado que tanto la especie vegetal en cuestión como el tipo de suelo actúan cooperativamente determinando la estructura y función de las comunidades microbianas de la rizosfera (Berg y Smalla, 2009). Por lo tanto, si bien los resultados aquí obtenidos podrían sugerir un comportamiento similar en las comunidades microbianas de otras especies vegetales sensibles a glifosato (ej. malezas), deberá estudiarse cada caso en particular para determinar las modificaciones que ocurren en la rizosfera y sus implicancias en el largo plazo sobre los cultivos sembrados en los mismos suelos. La mencionada especificidad de la microbiota rizosférica para cada especie vegetal impide extrapolar en forma directa los resultados hacia otros cultivos o malezas, abriendo el camino hacia un gran número de estudios pendientes acerca del impacto de glifosato en la rizosfera de plantas sensibles de relevancia agronómica.

7. Conclusiones

Los resultados de este estudio confirman la hipótesis planteada originalmente: las comunidades microbianas de la rizosfera de *Avena sativa* L. son influenciadas diferencialmente por el método de finalización aplicado al CC. Las diferencias se presentan tanto a nivel fisiológico como así también en la abundancia de grupos específicos de

microorganismos (entre ellos, BOA y AOA), e incluso a nivel de EGMs y estarían relacionadas con diferencias en los exudados radicales. A través de la reconocida modificación de la calidad y cantidad de los exudados, como así también mediante su propia exudación, el glifosato contribuiría en gran medida a las diferencias observadas aunque las evidencias del estudio resultan aún insuficientes para poder concluir ello y asignar causalidad únicamente al herbicida. No obstante, diferentes resultados, muchos de ellos observados a los 26 días, sugieren esta contribución del herbicida. La abundancia significativamente menor de los genes $amoA_{BOA}$ y $amoA_{AOA}$, un grupo de microorganismos de reconocida sensibilidad a pesticidas, podría explicarse por la exudación directa de glifosato a la rizosfera y de compuestos fenólicos inhibitorios o bien por la rizodeposición de estos compuestos liberados del tejido radicular senescente. De la misma manera, la mayor abundancia de un OTU identificado con una especie que presenta redundancia génica para degradar fosfonatos (*M. loti*) también podría explicarse por la presencia del ingrediente activo en el exudado de plantas tratadas con el herbicida. La observación de una menor respuesta respiratoria a los 26 días en el método con glifosato en presencia del exudado Ex_G respecto del exudado Ex_C , apoya la existencia de un proceso de aclimatación o adaptación de las comunidades microbianas rizosféricas, no observado en el método de corte. En este último, el incremento de la respuesta respiratoria frente a Ex_C sugiere una condición de estrés metabólico, posiblemente relacionada con la presencia del IA o de compuestos fenólicos inhibitorios derivados de la reconocida estimulación de la actividad PAL en la raíz por parte del glifosato.

El ordenamiento multivariado de los perfiles fisiológicos indicó una menor similitud entre comunidades de la rizosfera de plantas con y sin glifosato a los 26 días que a los 4 días. Asimismo, a los 26 días se observaron diferencias significativas en la diversidad catabólica y una mayor utilización de todos los sustratos carbonados. La exudación incrementada de aminoácidos y carbohidratos frente al herbicida, reportada en estudios previos, y posiblemente de otros compuestos carbonados, podría explicar estas observaciones. De la misma manera, la senescencia progresiva del tejido radicular contribuiría a niveles aumentados de sustratos en los rizodepósitos a los 26 días y explicaría también las diferencias observadas.

El estudio abordó por primera vez el análisis de EGMs comparando tratamientos con y sin glifosato. Los resultados indicaron claramente que a los 10 y 26 días post-tratamiento los plásmidos IncP-1 β e IncP-1 ϵ , respectivamente, sólo son detectables en el método de finalización con el herbicida, sugiriendo nuevamente una posible influencia del glifosato presente en los exudados o bien una mayor exudación de compuestos que estimulen la

actividad microbiana y por lo tanto, la conjugación bacteriana. Asimismo, la estructura de *Betaproteobacteria*, grupo bacteriano hospedador de plásmidos IncP-1, presentó diferencias entre ambos métodos de finalización también a los 10 días.

Finalmente, de acuerdo a los resultados del ordenamiento de perfiles fisiológicos y metagenómicos como así también de la detección de plásmidos IncP-1 se evidencia una clara tendencia en la dinámica de la respuesta: luego de 26 días post-tratamiento, sólo las comunidades microbianas rizosféricas de plantas tratadas con glifosato se asemejan a las comunidades presentes más tempranamente (4 días-glifosato y 4 días-corte). Por lo tanto, existe un carácter transitorio en la respuesta de las comunidades microbianas de la rizosfera de plantas tratadas con glifosato respecto de aquellas sometidas a corte.

El análisis metabolómico de los exudados mediante cromatografía gaseosa (GC) acoplada a un detector de espectrometría de masas (GC-MS) permitirá realizar una determinación cuantitativa comparativa tanto de glifosato como de diversos compuestos que podrían ver modificadas sus concentraciones en los exudados en respuesta a glifosato y que podrían explicar algunas de las observaciones mencionadas en este estudio.

DISCUSIÓN FINAL

1. *Discusión general de los diferentes capítulos*

Como se comentó en la Introducción General, el estudio del impacto de glifosato en comunidades del suelo ha sido extensamente estudiado debido al creciente interés en determinar los posibles efectos sobre organismos no blanco. Los microorganismos, específicamente bacterias, arqueas y hongos, se caracterizan por su capacidad de responder rápidamente a cambios ambientales, propiedad que los convierte en indicadores más sensibles respecto de los parámetros físicos y químicos en evaluaciones de impacto de herbicidas (Zabaloy *et al.*, 2011). Al mismo tiempo, la presencia de la enzima EPSPS los convierte en blancos potenciales del herbicida. Más aún, si bien se ha determinado la sensibilidad de determinadas especies, el rango completo de sensibilidad en comunidades microbianas no se conoce actualmente (Duke *et al.*, 2012), en parte debido a la diversidad que caracteriza a las comunidades microbianas. Estas consideraciones destacan la necesidad de profundizar los estudios de comunidades microbianas del suelo frente a glifosato, el objetivo central de esta Tesis. Asimismo, señalan la importancia de considerar a los microorganismos por sobre otros organismos del suelo en evaluaciones de impacto ambiental del herbicida. Las evaluaciones deben considerar no sólo al IA sino también al FC, deben ser lo más abarcativas posible incluyendo ambientes específicos y de gran relevancia ecológica como la rizosfera y deben considerar la inclusión de nuevos indicadores no evaluados previamente, que permitan determinar posibles impactos en el largo plazo sobre los servicios ecosistémicos. Entre estos indicadores se destacan, por ejemplo, los MOA, relacionados con el ciclo del N, y los EGMs relacionados con la dispersión de genes de resistencia en agroecosistemas. El estudio de los MOA y de EGMs en relación al herbicida glifosato constituye unos los aspectos más importantes de la Tesis y será discutido nuevamente en esta última sección.

Los resultados del ensayo PICT (Capítulo 1) indicaron que no existe una tolerancia incrementada a glifosato (tanto IA como FC) al comparar suelos con larga historia (H) y sin historia (NH) de exposición al herbicida. De acuerdo con la teoría PICT, una tolerancia incrementada en el sitio expuesto es un indicador de que han existido cambios en la comunidad, los cuales pueden incluir tanto 1) la muerte de las especies menos tolerantes de la comunidad y el reemplazo por las más tolerantes 2) la adaptación fisiológica de los individuos 3) la selección de los genotipos más tolerantes en una población. La observación de una mayor tolerancia es considerada entonces una fuerte evidencia de que el contaminante ha ejercido un efecto sobre la comunidad (Demoling y Bååth, 2008). La lógica

DISCUSIÓN FINAL

de esta teoría es de tipo popperiana dado que sólo la ausencia de una respuesta PICT es considerada una evidencia concluyente de que no ha existido una presión de selección en ninguno de los miembros de la comunidad que conduzca a un cambio en la misma (Blanck, 2002). En el caso de glifosato, este cambio podría estar relacionado con un efecto gradual sobre las eficiencias relativas de crecimiento en lugar de un efecto de toxicidad directo (muerte rápida de especies sensibles), particularmente teniendo en cuenta la gran adaptabilidad y versatilidad que caracteriza a las comunidades microbianas frente a condiciones cambiantes (Allison y Martiny, 2008), lo cual relativiza el concepto del efecto “tóxico” de ciertos compuestos químicos. Es decir, podría reducirse lentamente la abundancia de especies sensibles que derrochan energía en respuesta al estrés, y estimular la abundancia de aquellas adaptadas al uso rápido de los productos resultantes del cometabolismo (Zabaloy *et al.*, 2012). La ausencia de una respuesta PICT, reportada en el Capítulo 1 de esta Tesis, y la lógica popperiana de esta herramienta ecotoxicológica sugieren que este tipo de modificaciones no han ocurrido luego de varios años de historia de glifosato. Sin embargo, en base a los conceptos de estabilidad, resistencia y resiliencia de las comunidades microbianas presentados en la Introducción General de la Tesis (Allison y Martiny, 2008; Shade *et al.*, 2012), resulta pertinente plantear los tres escenarios posibles que podrían explicar los resultados del ensayo PICT:

1. El largo período de exposición a campo condujo a verdaderas modificaciones en la comunidad. Sin embargo, la fase de detección de la estrategia PICT utilizada no fue lo suficientemente sensible como para poner en evidencia estos cambios. El estrés asociado a la exposición crónica resultó insuficiente como para ejercer una presión de selección lo suficientemente intensa que conduzca a modificaciones detectables mediante la estrategia PICT utilizada (es decir, que se manifiesten en mayores valores del parámetro IC50).
2. Ocurrieron modificaciones, sin embargo, la resiliencia de las comunidades microbianas permitió la recuperación y por ello no se detecta un valor incrementado de IC50 en los suelos con historia del herbicida. En este caso, las aplicaciones reiteradas anualmente se podrían haber comportado como disturbios en lugar de suponer un estrés, es decir, los períodos de recuperación fueron de menor duración que el tiempo entre eventos (Borics *et al.*, 2012) permitiendo la recuperación. Como se mencionó en la Introducción General de la Tesis, existen diferentes características de los microorganismos, en especial de Bacteria y Arquea, que indican que la resiliencia podría ser un fenómeno común en las comunidades de las que forman parte. Alternativa o simultáneamente, la redundancia funcional podría estar

contribuyendo a que no se detecte una tolerancia incrementada en sitios con historia (Allison y Martiny, 2008), considerando especialmente que el parámetro utilizado en la fase de detección consistió en un parámetro de tipo funcional y no relacionado con la estructura de la comunidad.

3. No ocurrieron modificaciones debido a que la resistencia de las comunidades microbianas es suficientemente alta frente a las concentraciones reales de exposición al IA y a los aditivos del FC en condiciones de campo, durante el largo período de exposición.

La fuerte adsorción del glifosato en el suelo (Okada *et al.*, 2016) favorecería cualquiera de estas tres posibilidades. Asimismo, en el primer caso, la modificación del parámetro utilizado en la fase de detección permitiría determinar si realmente este parámetro ha sido lo suficientemente sensible. En relación a ello, es importante destacar que la lógica popperiana del ensayo PICT, mencionada anteriormente, sólo aplica en aquellos casos donde los parámetros de detección utilizados muestran una adecuada sensibilidad, sobre todo cuando la presión de selección del contaminante no ha sido lo suficientemente intensa (Blanck, 2002).

Los resultados del ensayo PICT permiten concluir que no existe una tolerancia incrementada de las comunidades microbianas al herbicida (IA o FC) a pesar de la exposición crónica, resultado particularmente novedoso teniendo en cuenta la larga historia de exposición y que hasta el momento no se ha utilizado la estrategia PICT con glifosato. No obstante, los tres escenarios previamente mencionados indican que las causas del resultado PICT negativo son inciertas y por lo tanto, no es posible concluir la ausencia de modificaciones en las comunidades a partir de la observación de una tolerancia no incrementada. En este sentido, los resultados del Capítulo 1 pusieron en evidencia la necesidad de profundizar los estudios en comunidades microbianas para determinar la existencia de cambios en las comunidades frente a aplicaciones de glifosato que no estuvieran siendo detectados con la estrategia PICT. Más aún, la utilización de un parámetro relacionado con la actividad microbiana (respiración inducida con ácido *p*-cumárico), en la fase de detección, podría verse influida por la redundancia funcional, propiedad ampliamente reconocida en comunidades microbianas del suelo (Allison y Martiny, 2008), tal como se comentó anteriormente. Esto implica que, aun cuando hubiesen existido cambios puntuales en la estructura de la comunidad, ello podría no verse reflejado en los valores de IC50, debido a la presencia de ciertos grupos microbianos que han compensado funcionalmente a aquellos afectados. En base a estas consideraciones, la estrategia PICT utilizada en este estudio en particular se corresponde con los indicadores a nivel de

comunidad de amplio rango o integrativos, descriptos en la Introducción General (Sección 4.1). Estos indicadores pueden ofrecer información importante sobre cambios mayores que afecten a la comunidad entera, pero podrían no ser lo suficientemente sensibles como para detectar cambios en poblaciones específicas o en la actividad de pequeñas subpoblaciones (Duke *et al.*, 2012). Debido a la enorme diversidad de las comunidades microbianas edáficas, los cambios en funciones o grupos clave pueden resultar indetectables si se evalúan sólo propiedades generales de la comunidad. Por lo tanto, una evaluación precisa y abarcativa del impacto sobre la microbiota requiere orientar también el estudio a grupos funcionales específicos que sean potencialmente afectados frente a una determinada situación y utilizar métodos que permitan analizar la estructura de la comunidad. Muchos autores sugieren que las medidas de estructura y actividad de grupos específicos de microorganismos que intervienen en procesos biológicos importantes del suelo, tienen la capacidad de proveer una forma rápida y sensible de caracterizar cambios en comunidades microbianas del suelo (Waldrop *et al.* 2000; Anderson, 2003; Bending *et al.*, 2004; Enwall *et al.*, 2005; Bressan *et al.*, 2008). Al respecto, cabe mencionar que, recientemente, paneles de expertos han recomendado la evaluación de los posibles efectos adversos de agroquímicos sobre la microbiota mediante estudios tanto a campo como a nivel de laboratorio, incluyendo nuevas herramientas de análisis que permitan determinar el impacto sobre grupos sensibles y ecológicamente relevantes (*EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues*, 2016; Karpouzas *et al.*, 2016).

Sobre estas consideraciones basadas en los resultados del ensayo PICT, se desarrolló el Capítulo 2 de la Tesis, abordando:

- El efecto de aplicaciones repetidas de glifosato en microcosmos. Este aspecto ha sido notablemente menos estudiado en relación a los efectos de aplicaciones únicas. Sin embargo adquiere una gran importancia considerando que la acumulación de múltiples aplicaciones en el tiempo puede ser la responsable de la presión de selección capaz de conducir a un incremento de tolerancia. De esta manera, los resultados podrían indicar posibles cambios esperables a largo plazo.
- El análisis de la estructura de la comunidad de bacterias oxidantes del amoníaco como un grupo funcional específico y ecológicamente relevante, reconocido como un indicador adecuado para la evaluación del riesgo ambiental de pesticidas (Karpouzas *et al.*, 2016; Wessen y Hallin, 2011) y sensible a un amplio espectro de químicos (Mertens *et al.*, 2006; Hernández *et al.*, 2011; Puglisi *et al.*, 2012; Rousidou *et al.*, 2013; Feld *et al.*, 2015).

DISCUSIÓN FINAL

Los resultados obtenidos en este segundo capítulo confirmaron la hipótesis inicial del estudio para una de las dos localidades evaluadas (Mayor Buratovich): la estructura de la comunidad de BOA se modificó luego de tres aplicaciones del FC en relación al control. Es decir, tanto los perfiles basados en ADN de este grupo de microorganismos (PCR-DGGE) como así también su abundancia relativa (qPCR) resultaron indicadores sensibles a aplicaciones repetidas. Estas diferencias observadas mediante métodos moleculares resultaron significativas únicamente con el FC, apoyando los resultados de estudios previos en microorganismos que reportan efectos diferenciales de formulados comerciales del herbicida respecto de los correspondientes ingredientes activos (Qiu *et al.*, 2013; Sihtmäe *et al.*, 2013). Por su parte, el análisis fisiológico indicó un mayor número de diferencias para el IA que para el FC. En conjunto, estos resultados ponen de manifiesto la importancia de considerar diferentes indicadores de estudio de comunidades microbianas, especialmente cuando se incluyen herbicidas en sus diferentes formas (IA y FC). El análisis basado únicamente en métodos moleculares hubiese permitido concluir que sólo el FC induce cambios, omitiéndose el impacto producido por el IA a nivel fisiológico. Por su parte, la utilización del RQ_{Ácido *p*-cumárico} como único indicador hubiese indicado que en el sitio H de BUR existen efectos del IA pero no del FC (Figura 14), omitiéndose el impacto de este último sobre la abundancia relativa y la composición de BOA (Figura 18).

En base a los resultados del Capítulo 2, se llevó a cabo un tercer estudio utilizando los mismos indicadores que mostraron ser sensibles en la detección de modificaciones tanto en la función (RQ_{Ácido *p*-cumárico}) como en la estructura de la comunidad (abundancia relativa y estructura de la comunidad de BOA) en microcosmos. No obstante, en este nuevo ensayo, en lugar de analizar el impacto de glifosato como único factor en estudio, se consideró simultáneamente un segundo factor potencialmente capaz de producir un disturbio en la comunidad: la exposición a un ciclo de desecación-humedecimiento. Al igual que en el estudio de aplicaciones repetidas, este experimento en microcosmos también se fundamentó, en parte, en los resultados del Capítulo 1. De acuerdo con la teoría PICT y el concepto de “costo de tolerancia” (Clements y Rohr, 2009), una forma de complementar y apoyar los resultados del estudio PICT consiste en analizar si la aplicación de glifosato influye o no en la sensibilidad de las comunidades ante un factor de disturbio. Si en el ensayo PICT se hubiese detectado una tolerancia incrementada al FC o al IA en el sitio H respecto del NH, como resultado de la exposición crónica, entonces podría esperarse lo que se conoce como “costo de tolerancia” (Clements y Rohr, 2009), es decir, una sensibilidad a otros disturbios/estreses secundarios, por ejemplo, desecación-humedecimiento. La ausencia de efectos significativos de un ciclo de desecación-humedecimiento en los RQ de

DISCUSIÓN FINAL

ambos sitios (H y NH) resultó entonces consistente con la ausencia de una respuesta PICT. En este ensayo de corta duración, una única aplicación del FC a microcosmos tampoco mostró efectos que condicionen la respuesta de la comunidad microbiana frente al disturbio de desecación-humedecimiento: la interacción no resultó significativa para ninguno de los genes indicadores de los distintos grupos microbianos analizados.

Como se mencionó anteriormente, los resultados del segundo estudio de esta Tesis (Capítulo 2) demostraron, por primera vez, que el RQ en presencia de ácido *p*-cumárico como sustrato es un indicador sensible, modificándose frente a aplicaciones repetidas. En base a ello, en esta Tesis se propone la utilización del mismo para futuros estudios de impacto de glifosato en suelo no rizosférico (como se indicó en el Capítulo 4, este indicador no mostró la misma sensibilidad en suelo rizosférico). Teniendo en cuenta que el ácido *p*-cumárico se trata de uno de los productos de la degradación microbiana de la lignina en el suelo (Bugg *et al.*, 2011), deberá investigarse a futuro si la estructura de las comunidades microbianas involucradas en este proceso de gran relevancia ecológica podría ser afectada también por la exposición a aplicaciones repetidas de glifosato, de la misma manera que el RQ_{Ácido *p*-cumárico}. Asimismo, deberá investigarse si las modificaciones en el catabolismo del ácido *p*-cumárico y de otros compuestos fenólicos similares, como consecuencia del impacto de aplicaciones repetidas, podrían afectar los niveles en el suelo de estos compuestos derivados de la descomposición de restos vegetales, muchos de los cuales han demostrado efectos alelopáticos. Guenzi y Mc Calla (1962), por ejemplo, reportaron inhibición del crecimiento de plántulas de trigo por parte de extractos acuosos de residuos de *A. sativa*, demostrando la presencia de ácido ferúlico, ácido *p*-hidroxibenzoico y vanílico. De manera similar, Schumacher *et al.* (1983) reportaron la presencia de ácido *p*-cumárico y vanílico en los exudados radicales de plantas de *A. fatua*, capaces de inhibir el crecimiento en trigo.

Por otra parte, como se mencionó en el Capítulo 2, la estimulación de la actividad de la enzima PAL reportada frente a glifosato podría impactar en el metabolismo del ácido *p*-cumárico y de compuestos relacionados que derivan de esta enzima. Si bien la estimulación de la actividad PAL frente a glifosato ha sido observada en plantas (Duke y Hoagland, 1978; Duke *et al.*, 1980) no se ha estudiado en bacterias y arqueas, a pesar de encontrarse presente en ellas (Emiliani *et al.*, 2009). Este aspecto fisiológico del impacto de glifosato deberá profundizarse en comunidades microbianas, de manera análoga a su estudio en plantas, considerando las posibles implicancias biológicas. La estimulación de la actividad PAL frente a glifosato adquiere todavía más relevancia a nivel de la rizosfera, si se tiene en cuenta que originalmente ha sido observada en raíces de plántulas de maíz y soja (Duke y Hoagland, 1978; Duke *et al.*, 1980), conduciendo a la producción de diversos compuestos

fenólicos. Una de las consecuencias indirectas podría ser el impacto sobre la abundancia de BOA y el proceso de nitrificación en la rizosfera, dado que ciertos compuestos fenilpropanoides relacionados (como el ácido metil-*p*-cumárico) son inhibidores biológicos de la nitrificación (Subbarao *et al.*, 2015). Esto explicaría entonces lo observado en el Capítulo 4: los genes *amoA*_{BOA} y *amoA*_{AOA} presentaron una menor abundancia en la rizosfera de plantas sensibles (*A. sativa*) tratadas con glifosato respecto del tratamiento sin herbicida (corte).

Otra de las consecuencias del impacto en el metabolismo de fenilpropanoides sobre comunidades microbianas podrían ser los efectos en la germinación de esporas fúngicas. Se ha determinado que en plantas sensibles a glifosato, el tratamiento con este herbicida conduce a una densa colonización de las raíces por hongos patógenos de los géneros *Fusarium* y *Phytophthora* (Johal y Rahe, 1984). De la misma manera, Lévesque *et al.* (1987) observaron tanto un incremento en la colonización de *Fusarium oxysporum* sobre raíces de malezas susceptibles, como así también un incremento en la densidad de propágulos fúngicos en el suelo. Originalmente se atribuyeron estas observaciones a una depleción de compuestos antifúngicos en la planta del tipo de las fitoalexinas que derivan de la vía inhibida por el glifosato, favoreciendo la infección y el crecimiento del hongo. Sin embargo, algo similar se ha observado en el caso de soja GR, donde no sería esperable esta deficiencia, detectándose una colonización incrementada de la raíz por parte de *Fusarium* spp. en estudios de corta (Zobiolo *et al.*, 2010) y larga duración (Kremer y Means, 2009), como así también un incremento en la densidad de propágulos fúngicos en el suelo. En relación a ello, Kremer *et al.* (2005) sugirieron, por primera vez, tres mecanismos que explicarían la estimulación selectiva de ciertas cepas de *Fusarium* spp. en la rizosfera de plantas tratadas con glifosato: 1) el propio glifosato presente en los exudados podría ser utilizado como nutriente 2) podría estimular la germinación de propágulos 3) ciertas moléculas específicas capaces de activar y estimular la germinación de propágulos podrían encontrarse en mayores cantidades en los exudados de plantas tratadas con glifosato. Para este tercer mecanismo, sin embargo, no se determinó qué compuestos específicamente podrían explicarlo, como así tampoco de qué manera el glifosato podría conducir a mayores niveles de los mismos en los exudados. La exudación incrementada de compuestos fenólicos derivados de la estimulación de la enzima PAL por glifosato en la raíz podría explicar la germinación de esporas fúngicas. Ciertos compuestos fenólicos pueden actuar como disparadores de la germinación de esporas fúngicas en la rizosfera (Philipott *et al.*, 2013), entre ellos el ácido cinámico, el ácido ferúlico y el ácido benzoico (Yang *et al.*, 2015).

DISCUSIÓN FINAL

De acuerdo con la revisión de la literatura, los mecanismos mencionados anteriormente (inhibición de la nitrificación y germinación de esporas fúngicas por exudación incrementada de compuestos fenólicos) no han sido postulados hasta el momento como mecanismos indirectos de impacto de glifosato en comunidades microbianas de la rizosfera. Por ende, se proponen por primera vez como mecanismos posibles que deberán ser abordados en futuras investigaciones. Se trata de un modelo de impacto basado en la revisión de la literatura existente, ya que no se ha investigado en esta Tesis si efectivamente existe una exudación incrementada de compuestos fenólicos producto de la estimulación de la enzima PAL. Sin embargo, podría explicar adecuadamente las observaciones citadas previamente como así también diferentes resultados presentados en el Capítulo 4. Este último capítulo de la Tesis abordó un aspecto de central importancia para un análisis abarcativo del impacto de un herbicida: los efectos sobre las comunidades microbianas de la rizosfera de un cultivo sensible. Si bien la revisión de la literatura indica que la mayor parte de los estudios de impacto de glifosato se han centrado en suelo no rizosférico (Introducción general, Sección 5), debe tenerse en cuenta que las diferentes prácticas agronómicas podrían tener una influencia importante en las comunidades microbianas en estrecha relación con la planta. Los efectos de herbicidas sobre interacciones planta-microorganismo deben ser incluidos en las evaluaciones de riesgo ambiental. Las comunidades microbianas de la rizosfera, en particular, se encuentran en íntimo contacto con la planta y han sido designadas como su “segundo genoma” (Mendes *et al.*, 2013), por lo tanto, conocer sus modificaciones frente a diferentes prácticas agronómicas (ej.: métodos de finalización de cultivos de cobertura) es un aspecto fundamental en el que se debe profundizar. Las interacciones planta-microorganismo en la rizosfera tienen un rol central en los ciclos biogeoquímicos y en el mantenimiento de la salud y productividad vegetal. Más aún, la reconocida exudación del glifosato hacia la rizosfera en plantas sensibles y resistentes al herbicida y la modificación de la composición química de los exudados plantea un cambio importante en el paradigma de estudio de impacto de glifosato, considerando que se trata de un mecanismo de exposición de las comunidades microbianas completamente diferente a los mecanismos tradicionalmente estudiados (intercepción directa y lixiviación del herbicida). De hecho, los estudios de exudación de glifosato de Laitinen *et al.* (2007) demostraron que un cultivo sensible podía exudar cantidades significativas en un corto período de tiempo (entre un 4 y un 10% del glifosato aplicado, en 8 días), reconociendo la necesidad de considerar este mecanismo de ingreso del herbicida al suelo en las evaluaciones de impacto ambiental. Si se tiene en cuenta además la notable cantidad de procesos bioquímicos que ocurren en la rizosfera y de los cuales depende la planta, como así también la presencia de *hot spots* que

favorecen la THG, las modificaciones a nivel de la rizosfera podrían impactar tanto a nivel de productividad como de salud vegetal, animal e incluso en la salud humana en el largo plazo, tal como se discutió en el Capítulo 4.

Las evidencias obtenidas indicaron que las comunidades microbianas de la rizosfera de *A. sativa* son influenciadas diferencialmente por el método de finalización aplicado al CC. Por lo tanto, fue posible confirmar la hipótesis propuesta y cumplir con el objetivo planteado originalmente, un aspecto particularmente novedoso considerando que la microbiota rizosférica en *A. sativa* no había sido estudiada previamente comparando ambos métodos de finalización. Más aún, de acuerdo con las búsquedas realizadas en la base de datos SCOPUS, no se encontraron reportes sobre el metagenoma de la rizosfera de *A. sativa*. En cambio, se han estudiado otras especies de este género relacionadas como *A. fatua* (DeAngelis *et al.*, 2009) y *A. strigosa* (Turner *et al.*, 2013). Tampoco se encontraron reportes relacionados con el análisis de plásmidos BHR o de integrones en tratamientos con glifosato, o de los efectos de estos tratamientos sobre la conjugación bacteriana, si bien se han estudiados efectos sobre la frecuencia de transformación bacteriana (Watson y Carter, 2008).

Los diversos resultados presentados en el Capítulo 4 podrían ser explicados consistentemente en base a estudios previos sobre los efectos de glifosato en otras especies, de acuerdo al modelo presentado en la siguiente sección, apoyando de esta manera la contribución del herbicida a las diferencias observadas.

2. Modelo integrador del impacto de glifosato en la rizosfera

La integración de los múltiples resultados obtenidos en el Capítulo 4 junto con reportes previos de la literatura (1978-actualidad) (Figura 49), sugieren que las diferencias entre ambos métodos de finalización podrían ser explicadas en base a diferencias en los rizodepósitos inducidas por glifosato, particularmente a los 26 días post-tratamiento, donde se observó el mayor número de diferencias. Mientras que la exudación de aminoácidos y carbohidratos estimulada por glifosato (Kremer *et al.*, 2005), explicaría la mayor utilización de sustratos carbonados y el incremento en la diversidad catabólica, la estimulación de la actividad PAL en la raíz (Duke y Hoagland, 1978; Duke *et al.*, 1980) con la consecuente producción de ciertos compuestos fenólicos inhibitorios podría explicar la menor abundancia observada para microorganismos sensibles a estos compuestos como BOA y AOA (Figura 49). Más aún, el amonio producido en la reacción catalizada por la enzima PAL en la raíz podría generar zonas de concentración local alta de amonio en la rizosfera, una condición que estimula la liberación de IBNs (Subbarao *et al.*, 2015). Asimismo, la translocación y

DISCUSIÓN FINAL

exudación directa de glifosato explicaría consistentemente la mayor abundancia de una especie bacteriana (*M. loti*) con un potencial metabólico redundante para degradar fosfonatos mediante C-P liasas y la mayor utilización del sustrato sarcosina (Figura 49).

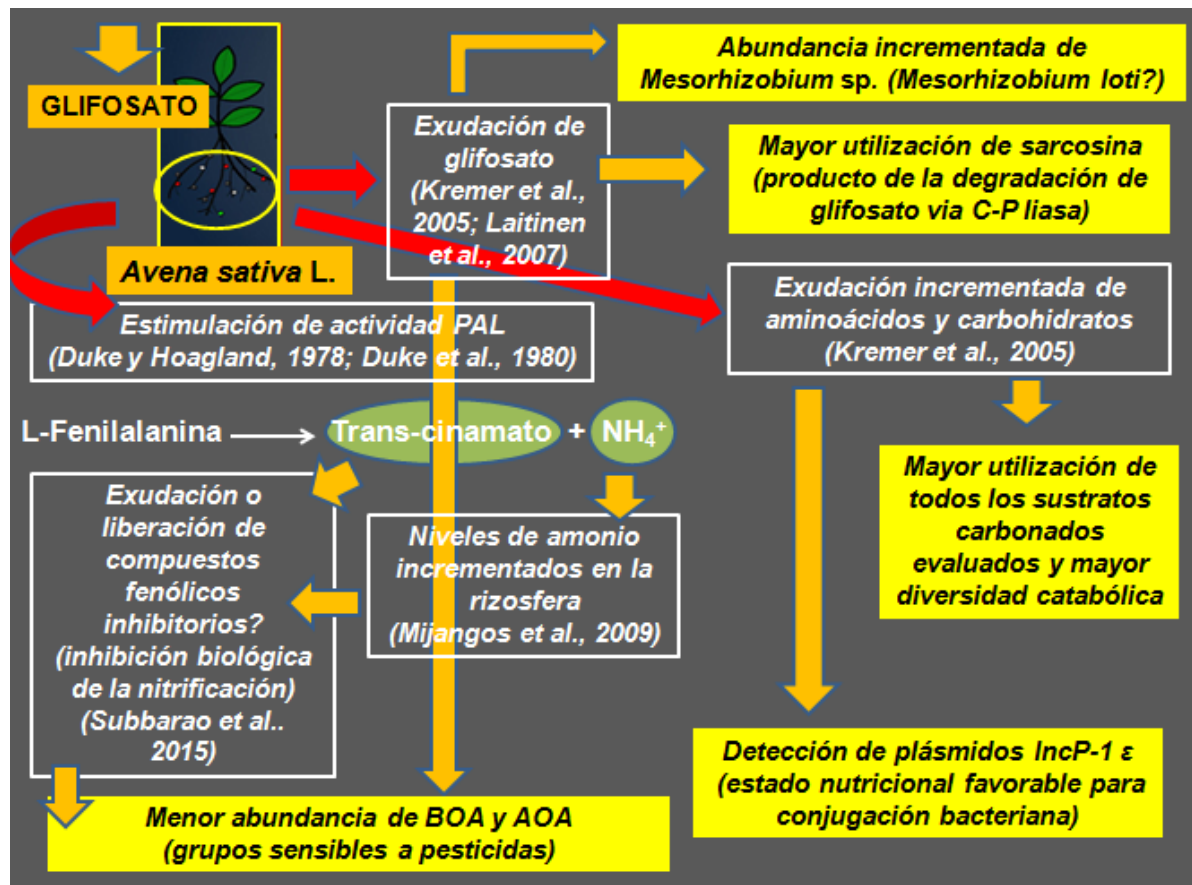


Figura 49. Modelo integrador propuesto para explicar las diferencias observadas en comunidades microbianas rizosféricas de *A. sativa*. Los recuadros amarillos corresponden a los resultados obtenidos en la rizosfera de plantas finalizadas con glifosato respecto de plantas sometidas a corte. Todos los resultados, excepto la menor abundancia de BOA, corresponden a la última fecha de muestreo (26 días). Los recuadros blancos indican observaciones de estudios previos en la rizosfera de otras especies sensibles tratadas con glifosato.

Todas estas diferencias revisten importancia a nivel agronómico para cultivos de cosecha sucesores sembrados luego de un período de 26 días. Si bien los residuos de glifosato exudados a la rizosfera podrían tener efectos indeseados en plantas sensibles sembradas en el mismo suelo, tal como se ha demostrado en otros estudios (Rodrigues *et al.*, 1982; Neumann *et al.*, 2006; Tesfamariam *et al.*, 2009), el enriquecimiento en microorganismos degradadores de fosfonatos (ej. *M. loti*) en la rizosfera podría atenuar estos efectos. Mediante la utilización de glifosato marcado con ^{14}C , Ricordi *et al.* (2007) demostraron que puede producirse la translocación de glifosato desde plantas blanco hacia aquellas no blanco por medio de la exudación pero sin llegar a niveles suficientes como para detectar

DISCUSIÓN FINAL

efectos significativos de inhibición en su crecimiento. Tanto la adsorción como la presencia de microorganismos degradadores en la rizosfera podrían contribuir a reducir los niveles biodisponibles de glifosato y sus efectos en plantas sucesoras. Asimismo, debe tenerse en cuenta que la degradación de glifosato por la vía de la sarcosina impediría la formación de AMPA, el cual se degrada más lentamente y posee una demostrada fitotoxicidad (Duke *et al.*, 2012). Por lo tanto, un enriquecimiento en microorganismos degradadores mediante la actividad C-P liasa podría contribuir también a la degradación del glifosato acumulado en el suelo como resultado de la exposición crónica, evitando productos de degradación tóxicos como el AMPA. Este aspecto deberá abordarse en futuros estudios. De la misma manera, será importante determinar si existe una posible condición de deficiencia de fósforo en la rizosfera que pueda relacionarse con las observaciones mencionadas ya que esta deficiencia no sólo estimula la degradación de glifosato por C-P liasas bacterianas (generando sarcosina) (Sviridov *et al.*, 2012) sino también la exudación radical de compuestos fenólicos (Chishaki y Horiguchi, 1997).

Por otra parte, una menor tasa de nitrificación en la rizosfera de plantas tratadas con glifosato (como consecuencia de una menor abundancia de BOA y AOA) podría conducir a una mayor disponibilidad de N en forma de amonio, reduciéndose las pérdidas por lixiviación de nitratos o por desnitrificación. Los resultados observados para BOA y AOA remarcen la importancia de continuar estudiando las comunidades de microorganismos oxidantes del amoníaco de la rizosfera para determinar cómo podría afectarse la nitrificación, proceso clave en el ciclo del nitrógeno. Particularmente, deberá analizarse el poder de inhibición biológica de la nitrificación de los exudados radicales de plantas sensibles tratadas con el herbicida (análisis funcional), mediante ensayos *high-throughput* recientemente reportados (O' Sullivan *et al.*, 2017), como así también las modificaciones en la diversidad de las comunidades de BOA y AOA mediante secuenciación de amplicones del gen *amoA*.

Por último, dada la particular propiedad de la rizosfera de ser un *hot spot* para la THG, otros manejos dependientes del uso de pesticidas que al igual que glifosato modifiquen el patrón de rizodeposición incrementando el contenido de nutrientes en los exudados, podrían favorecer la dispersión de genes de resistencia mediante la estimulación de la conjugación bacteriana resultante de dicho enriquecimiento (Heuer y Smalla, 2012; Mølbak *et al.*, 2007) (Figura 49). La diferencia observada en plásmidos del subgrupo IncP-1 ϵ a los 26 días es particularmente relevante a nivel de salud humana y animal dado que una mayor abundancia de este subgrupo de plásmidos en la rizosfera de plantas tratadas con glifosato podría contribuir a una mayor dispersión de genes de resistencia presentes en el resistoma del suelo (Heuer *et al.*, 2012). Existe un cuerpo de evidencias cada vez mayor que

demuestra que los microorganismos ambientales pueden ser resistentes a diferentes antibióticos. Los genes que constituyen el “resistoma” ambiental tienen el potencial de ser transferidos a patógenos y diferentes evidencias demuestran que ciertos genes de resistencia clínicamente relevantes provienen de microorganismos ambientales (Wright *et al.*, 2010).

3. Consideraciones finales

El análisis de impacto de glifosato en comunidades microbianas realizado en esta Tesis incluyó estudios observacionales a campo (PICT: Capítulo 1) y manipulativos (en microcosmos: Capítulo 2 y 3; en invernáculo: Capítulo 4), y también se consideraron diferentes comunidades microbianas del suelo (rizosféricas y no rizosféricas), como así también diferentes formas del herbicida (IA y FC). En conjunto los resultados indican que las BOA constituyen un grupo indicador que es sensible a formulados comerciales de glifosato tanto en suelo rizosférico (Capítulo 4) como no rizosférico (Capítulo 2), como así también frente a aplicaciones repetidas (Capítulo 2) o bajo una única aplicación (Capítulo 4). Otro indicador, el RQ_{Ácido *p*-cumárico}, mostró sensibilidad tanto al IA como al FC, pero sólo para comunidades microbianas no rizosféricas y frente a aplicaciones repetidas (Capítulo 2) mientras que en la rizosfera (Capítulo 4) no resultó afectado. Las AOA, a diferencia de las BOA, fueron sensibles sólo en suelo rizosférico (Capítulo 4), en comparación con la ausencia de modificaciones de este grupo en suelo no rizosférico (Capítulo 3). Sin embargo, las AOA no fueron analizadas frente a aplicaciones repetidas, por lo tanto, se desconoce si la abundancia relativa o la estructura de la comunidad de AOA podrían modificarse de igual modo que las BOA (Capítulo 2). De esta manera, más allá de la relevancia biológica intrínseca que revisten estos indicadores por su relación con procesos claves en el ciclo del C y del N, guardan también un interés aplicado para el monitoreo de comunidades microbianas en diferentes condiciones y bajo diferentes tratamientos basados en la utilización del herbicida. Su sensibilidad y relevancia ecológica permite proponerlos entonces como candidatos en futuros análisis de impacto de glifosato. Por otra parte, es importante resaltar también que no se trata de indicadores relacionados únicamente con comunidades bacterianas, como es el caso de BOA, sino que también involucran a arqueas (AOA) y a hongos (RQ_{Ácido *p*-cumárico}).

Otros indicadores, por el contrario, no resultaron afectados, entre ellos, bacterias totales y *Actinobacteria*. Como se mencionó en la Introducción General de la Tesis, las modificaciones en este último grupo de bacterias podrían tener importantes efectos sobre las comunidades microbianas debido, entre otros aspectos, a su notable capacidad de producir diversos antibióticos que poseen propiedades inhibitorias (rol de competencia)

DISCUSIÓN FINAL

como así también propiedades regulatorias a concentraciones sub-inhibitorias (Aminov, 2009). Por lo tanto, si bien en esta Tesis no se han observado efectos de tratamientos con glifosato sobre la abundancia de *Actinobacteria*, sería importante continuar estudiando este grupo en evaluaciones de impacto de otros pesticidas o de determinados manejos agronómicos, particularmente en base a la reciente asignación de diversos roles de los antibióticos a concentraciones sub-inhibitorias ambientales. La señalización a estas concentraciones podría haber evolucionado como una forma de comunicación interdominio en varios ecosistemas, resultando en respuestas genotípicas y fenotípicas adaptativas de la microbiota y de otros miembros de la comunidad (Aminov *et al.*, 2009).

Dentro del objetivo general de la Tesis se planteó la necesidad de contribuir al desarrollo de bioindicadores apropiados para la evaluación de la sustentabilidad ambiental de las prácticas agrícolas en la región, que puedan ser aplicados en programas de monitoreo en el largo plazo. Los resultados mencionados anteriormente para BOA, AOA y RQ^{Ácido p-cumárico} indican que este objetivo ha sido cumplido. Cada uno de estos indicadores no sólo es sensible en una determinada condición sino que además se relacionan con procesos bioquímicos ecológicamente relevantes. Más aún, en el Capítulo 4 se propuso la utilización de un indicador completamente diferente a estos indicadores a nivel rizosférico, los plásmidos IncP-1. La particular promiscuidad de estos plásmidos, junto con su capacidad de transferir genes horizontalmente involucrados en la adaptación y el desempeño funcional de las comunidades microbianas los convierte en importantes indicadores. La detección (presencia/ausencia) frente a tratamientos con glifosato podría indicar, indirectamente, cambios en las funciones de la comunidad. Sumado a este rol ecológico, los plásmidos IncP-1 como indicadores revisten importancia también a nivel de salud humana. Los plásmidos IncP-1 ϵ , en particular, han sido reconocidos como importantes vectores de genes de resistencia a antibióticos en agroecosistemas. Este aspecto dual de vinculación con las funciones de la comunidad microbiana y con la salud humana los convierte en indicadores únicos en relación a otros indicadores clásicamente empleados. Las diferencias en la detección de estos plásmidos en el método de finalización con glifosato respecto del método de corte (evidenciada en el Capítulo 4) resalta la importancia de estudiar las modificaciones que pudieran ocurrir a largo plazo en la abundancia de plásmidos IncP-1 en el ambiente edáfico frente a la sostenida utilización del herbicida.

CONCLUSIÓN FINAL

CONCLUSIÓN FINAL

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral indicaron que la exposición crónica a glifosato en suelos agrícolas de tres localidades de la Región Pampeana no condujo a un incremento en la tolerancia respecto de suelos de referencia sin historia del herbicida. La ausencia de un fenómeno de tolerancia de la comunidad inducida por el contaminante (PICT), tanto para el IA como para el FC, fue apoyada por un resultado negativo de costo de tolerancia frente a un disturbio secundario (desección-humedecimiento). Sin embargo, la tolerancia no incrementada no fue considerada evidencia suficiente para concluir la ausencia de cambios en las comunidades durante el largo período de exposición a campo. Los resultados de estudios posteriores de corta duración, tanto en suelo rizosférico como no rizosférico, indicaron diferencias en grupos específicos de microorganismos entre tratamientos con y sin glifosato, sugiriendo un posible impacto de glifosato a largo plazo y la necesidad de profundizar el estudio, aun cuando no sean detectables diferencias en la tolerancia mediante la estrategia PICT.

En suelo no rizosférico, la acumulación de tres aplicaciones de un FC modificó la abundancia de BOA en relación a bacterias totales (abundancia relativa) como así también la estructura de la comunidad de este grupo de microorganismos, en ambos sitios (H y NH). Sin embargo, esto sólo se observó con el FC y no con el IA, reflejando un posible efecto de los adyuvantes o de su interacción con el IA. Las modificaciones en la abundancia relativa fueron opuestas en suelos H y NH, indicando diferencias en las comunidades de ambos sitios. Estas diferencias en la abundancia relativa y en la estructura de BOA, luego de tres aplicaciones del FC, se observaron sólo en una de las dos localidades estudiadas (Mayor Buratovich), en donde también se observaron diferencias a nivel fisiológico ($RQ_{\text{Ácido } p\text{-cumárico}}$). Contrariamente, en Zavalla no se observaron diferencias significativas con el FC, sólo se detectaron incrementos en el $RQ_{\text{Ácido } p\text{-cumárico}}$ frente al IA y únicamente en el suelo con historia de glifosato. Los incrementos observados en el $RQ_{\text{Ácido } p\text{-cumárico}}$ luego de tres aplicaciones del herbicida indican un estrés metabólico en microorganismos capaces de catabolizar este fenilpropanoide de relevancia ecológica en el suelo.

La sensibilidad de las BOA como indicador frente a tres aplicaciones de un FC (en suelo no rizosférico) fue consistente con la sensibilidad observada posteriormente en la rizosfera de plantas de *Avena sativa* L. secadas con glifosato. Para este método de finalización, la abundancia de BOA (absoluta y relativa) disminuyó en relación al tratamiento sin herbicida (corte). Las AOA mostraron una abundancia significativamente menor luego de 26 días. La posible exudación de compuestos fenólicos inhibitorios en cantidades incrementadas debido a la estimulación de la enzima PAL en la raíz, podría explicar estas observaciones. Los

CONCLUSIÓN FINAL

efectos diferenciales observados, mayoritariamente a los 26 días post-tratamiento, estarían relacionados con la reconocida modificación de la cantidad y calidad de los exudados inducida por glifosato, como así también por la propia exudación de este compuesto y por diferencias en los rizodepósitos al producirse el decaimiento del tejido radicular. Asimismo, los resultados indican la necesidad de evaluar si las comunidades microbianas asociadas a las raíces remanentes de plantas finalizadas por uno u otro método podrían influir diferencialmente en el desarrollo del cultivo sucesor para una fecha post-finalización cercana a los 26 días. En esta fecha se observó el mayor número de diferencias entre comunidades microbianas rizosféricas de plantas sometidas a ambos métodos de finalización, tanto en la fisiología de las comunidades microbianas (índices de diversidad catabólica, ordenamiento de los perfiles fisiológicos y respuesta respiratoria frente a un exudado radical de plantas tratadas con glifosato) como así también en la abundancia de microorganismos específicos. Entre estos se encuentran tanto arqueas (AOA) como bacterias (*Bacillales* y una especie del género *Mesorhizobium*, posiblemente *M. loti*, de particular potencial para degradar fosfonatos). Más aún, los plásmidos IncP-1 ϵ , involucrados en la dispersión de genes de resistencia en agroecosistemas, fueron detectados sólo en la rizosfera de plantas tratadas con glifosato. El método de finalización, en cambio, no mostró efectos sobre indicadores integradores como los índices de diversidad alfa ni tampoco en el ordenamiento de las comunidades a través de los diferentes tratamientos (diversidad beta).

En conjunto, los resultados demuestran la importancia de evaluar el impacto del herbicida considerando exposiciones de larga duración a campo y de corta duración en microcosmos, la importancia de considerar aplicaciones repetidas e interacciones con disturbios secundarios, de incluir al ingrediente activo y al formulado comercial, de considerar indicadores múltiples (fisiológicos y moleculares) ecológicamente relevantes y específicos (incluyendo EGMs) y de comenzar a explorar en mayor profundidad los efectos sobre la rizosfera de cultivos sensibles, especialmente sobre microorganismos oxidantes del amoníaco. El impacto de la microbiota rizosférica asociada a las raíces de plantas tratadas con glifosato sobre cultivos sucesores plantea un nuevo escenario dentro de las evaluaciones de riesgo ambiental del herbicida, siendo necesaria su consideración para lograr un abordaje abarcativo y riguroso de los efectos a largo plazo.

ANEXO

ANEXO I

Ecuaciones de los modelos de ajuste no lineal utilizados para curvas dosis-respuesta con hormesis

(*drc* package, R Statistical Software)

(Knezevic *et al.*, 2007; Ritz y Streibig, 2012; Ritz y Streibig, 2013)

Modelo Brain-Cousens

$$Y = c + \{d + fx - c / 1 + \exp[b(\log x - \log e)]\}$$

Modelo Cedergreen-Ritz-Streibig

$$Y = 0 + \frac{d - 0 + f \exp(-1/x)}{1 + \exp(b(\log(x) - \log(e)))}$$

Donde:

c = límite inferior

d = límite superior

e = punto de inflexión

b = pendiente relativa en torno a e

f = término de hormesis

Modelo Gaussiano

$$Y = c + (d - c) \exp(-0,5\{(x - e)/b\}^f)$$

Donde:

c = límite inferior

d = límite superior

e = punto de inflexión

b = pendiente relativa en torno a e

f = término de asimetría entre ambos lados del pico

ANEXO II

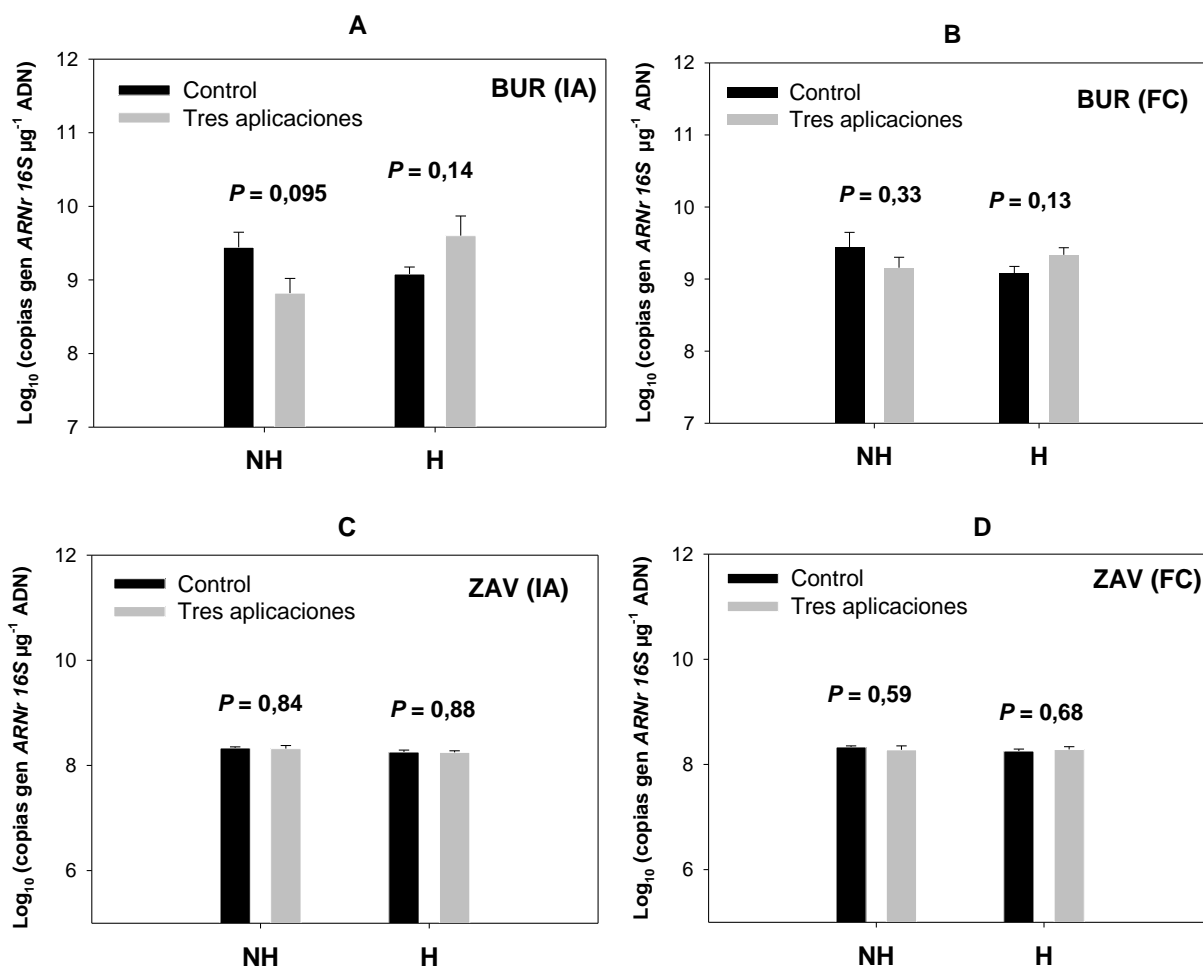


Figura 50. Cuantificación de bacterias totales mediante PCR cuantitativa. Se indica el número de copias (copias μg^{-1} de ADN) del gen que codifica para el ARNr 16S, en microcosmos control y con tres aplicaciones acumuladas de glifosato, para sitios con (H) y sin (NH) historia del herbicida en Mayor Buratovich (BUR, **A-B**) y Zavalla (ZAV, **C-D**). Las figuras **A-D** corresponden al ingrediente activo (IA) y **B-D** al formulado comercial (FC). Las barras de error corresponden al error estándar de la media ($n=3$). Los asteriscos indican diferencias significativas (Test-t para muestras independientes, $P<0,05$). La ausencia de asteriscos indica que no se detectaron diferencias significativas. Los valores de probabilidad asociada se encuentran indicados para cada comparación de medias.

ANEXO

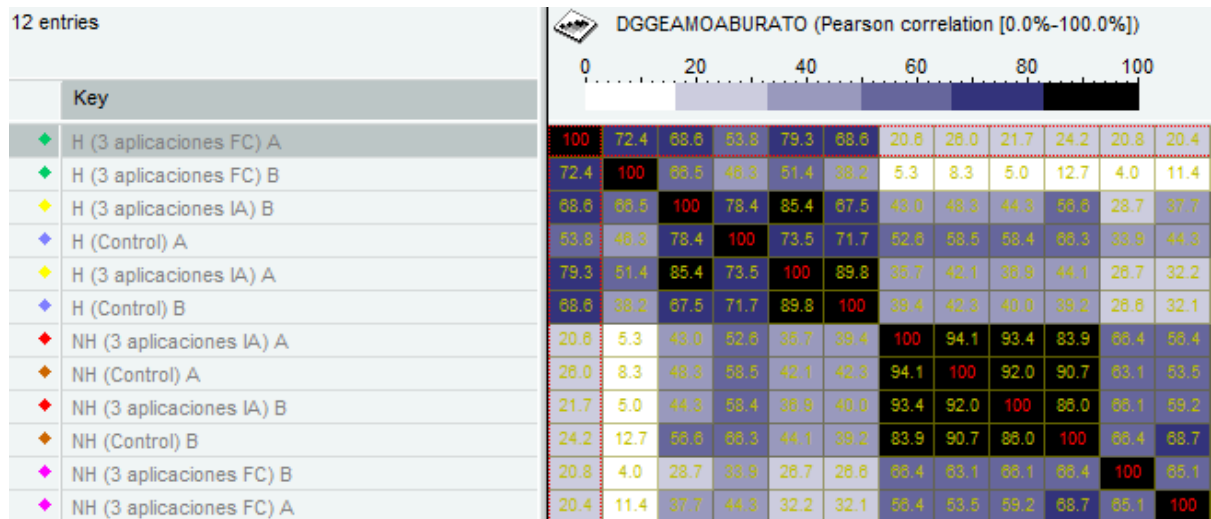


Figura 51. Matriz de similitudes correspondiente a Mayor Buratovich. Se indican los coeficientes de correlación de Pearson (0-100%) entre cada par de calles del gel en diferentes colores de acuerdo al nivel de similitud. La matriz de similitud fue obtenida mediante el software Gel Comprar II, recomendado para el análisis de perfiles de DGGE.

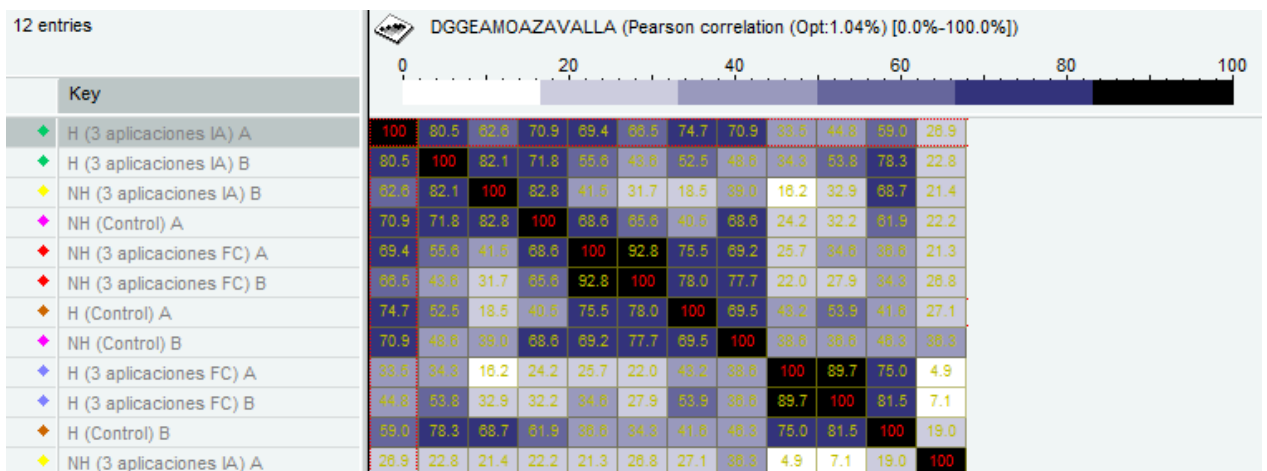


Figura 52. Matriz de similitudes correspondiente a Zavalla. Se indican los coeficientes de correlación de Pearson (0-100%) entre cada par de calles del gel en diferentes colores de acuerdo al nivel de similitud. La matriz de similitud fue obtenida mediante el software Gel Comprar II, recomendado para el análisis de perfiles de DGGE.

ANEXO

ANEXO III

Tabla 51. Número de copias de genes indicadores para cada nivel del factor desecación-humedecimiento. Se indican las medias correspondientes a cada grupo microbiano. Los valores entre paréntesis corresponden al error estándar de la media ($n=6$). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P<0,05$).

Número de copias de genes indicadores μg^{-1} ADN				
Desecación-humedecimiento	Bacterias totales	<i>Actinobacteria</i>	BOA	AOA
Sin (SD)	$1,21 \cdot 10^9$ ($1,6 \cdot 10^8$) ^a	$1,83 \cdot 10^7$ ($2,83 \cdot 10^6$) ^a	$9,05 \cdot 10^5$ ($8,47 \cdot 10^4$) ^a	$2,58 \cdot 10^7$ ($2,66 \cdot 10^6$) ^a
Con (CD)	$1,09 \cdot 10^9$ ($5,58 \cdot 10^7$) ^a	$2,56 \cdot 10^7$ ($3,23 \cdot 10^6$) ^a	$1,15 \cdot 10^6$ ($3,16 \cdot 10^4$) ^b	$3,29 \cdot 10^7$ ($1,5 \cdot 10^6$) ^a

Tabla 52. Número de copias de genes indicadores para cada nivel del factor glifosato. Se indican las medias correspondientes a cada grupo microbiano. Los valores entre paréntesis corresponden al error estándar de la media ($n=6$). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P<0,05$).

Número de copias de genes indicadores μg^{-1} ADN				
Glifosato	Bacterias totales	<i>Actinobacteria</i>	BOA	AOA
Sin (SG)	$1,16 \cdot 10^9$ ($1,45 \cdot 10^8$) ^a	$2,29 \cdot 10^7$ ($3,39 \cdot 10^6$) ^a	$1,06 \cdot 10^6$ ($9,14 \cdot 10^4$) ^a	$2,95 \cdot 10^7$ ($2,46 \cdot 10^6$) ^a
Con (CG)	$1,14 \cdot 10^9$ ($1,03 \cdot 10^8$) ^a	$2,10 \cdot 10^7$ ($3,44 \cdot 10^6$) ^a	$9,94 \cdot 10^5$ ($7,21 \cdot 10^4$) ^a	$2,91 \cdot 10^7$ ($2,89 \cdot 10^6$) ^a

Tabla 53. Abundancia relativa (AR) de los distintos grupos analizados para cada nivel del factor glifosato. Los valores corresponden a la relación entre el número de copias del gen indicador de cada grupo (BOA, *Actinobacteria*) y el gen del ARNr 16S de *Eubacteria*. También se indica la relación entre el gen *amoA*_{AOA} y el gen *amoA*_{BOA} (AOA:BOA). Los valores entre paréntesis corresponden al error estándar de la media ($n=6$). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P<0,05$).

AR genes indicadores			
Glifosato	AR (BOA)	AR (<i>Actinobacteria</i>)	AOA:AOB
Sin (SG)	$9,5 \cdot 10^{-4}$ ($1,1 \cdot 10^{-4}$) ^a	$2,1 \cdot 10^{-2}$ ($3,86 \cdot 10^{-3}$) ^a	28,22 (1,46) ^a
Con (CG)	$8,82 \cdot 10^{-4}$ ($7,12 \cdot 10^{-5}$) ^a	$1,9 \cdot 10^{-2}$ ($3,61 \cdot 10^{-3}$) ^a	29,31 (2,44) ^a

Tabla 54. Abundancia relativa (AR) de los distintos grupos analizados para cada nivel del factor desecación-humedecimiento. Los valores corresponden a la relación entre el número de copias del gen indicador de cada grupo (BOA, *Actinobacteria*) y el gen del ARNr 16S de *Eubacteria*. También se indica la relación entre gen *amoA*_{AOA} y el gen *amoA*_{BOA} (AOA:BOA). Los valores entre paréntesis corresponden al error estándar de la media ($n=6$). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P<0,05$).

AR genes indicadores			
Desecación-humedecimiento	AR (BOA)	AR (<i>Actinobacteria</i>)	AOA:AOB
Sin (SD)	$7,7 \cdot 10^{-4}$ ($7,87 \cdot 10^{-5}$) ^a	$1,61 \cdot 10^{-2}$ ($3,24 \cdot 10^{-3}$) ^a	28,79 (2,66) ^a
Con (CD)	$1,06 \cdot 10^{-3}$ ($5,37 \cdot 10^{-5}$) ^b	$2,39 \cdot 10^{-2}$ ($3,43 \cdot 10^{-3}$) ^a	28,74 (1,06) ^a

Tabla 55. Contribución de las variables a las componentes 1 (CP1) y 2 (CP2) del análisis de componentes principales integrando datos fisiológicos y moleculares. El análisis se realizó sobre los datos multivariados de los cuatro tratamientos evaluados en el sitio con historia de glifosato (H). SD/SG: Sin desecación-humedecimiento/Sin glifosato; SD/CG: Sin desecación-humedecimiento/Con glifosato; CD/SG: Con desecación-humedecimiento/Sin glifosato; CD/CG: Con desecación-humedecimiento/Con glifosato.

Variables	Contribución de las variables a las componentes principales (%)	
	Dim.1 (CP1)	Dim.2 (CP2)
Log copias gen del ARNr 16S _{<i>Actinobacteria</i>}	70,06	26,85
Log copias gen <i>amoA</i> _{BOA}	13,03	20,06
Log copias gen <i>amoA</i> _{AOA}	14,64	52,91
RQ _{Ácido p-cumárico}	2,27	0,17

ANEXO

ANEXO IV

Tabla 56. Contribución de las variables a las componentes principales 1 (CP1) y 2 (CP2) y correlación con cada una de ellas.

Variables	Contribución de las variables a las componentes principales (%)		Correlación de las componentes con las variables originales	
	Dim.1 (CP1)	Dim.2 (CP2)	Dim.1 (CP1)	Dim.2 (CP2)
L-Fenilalanina	11,21	$1,17 \cdot 10^{-6}$	0,96	$7,54 \cdot 10^{-5}$
L-Asparagina	7,69	4,14	0,94	$1,69 \cdot 10^{-1}$
Sarcosina	14,09	14,84	0,96	$-2,39 \cdot 10^{-1}$
D-Celobiosa	8,11	4,69	0,94	$1,74 \cdot 10^{-1}$
D-Xilosa	10,22	5,26	0,93	$1,63 \cdot 10^{-1}$
Ácido pirúvico	12,88	4,04	0,97	$1,33 \cdot 10^{-1}$
Ácido fumárico	13,03	0,271	0,97	$3,41 \cdot 10^{-2}$
Ácido <i>p</i> -cumárico	7,92	19,95	0,88	$3,42 \cdot 10^{-1}$
Tween 20	14,83	46,81	0,91	$-3,93 \cdot 10^{-1}$

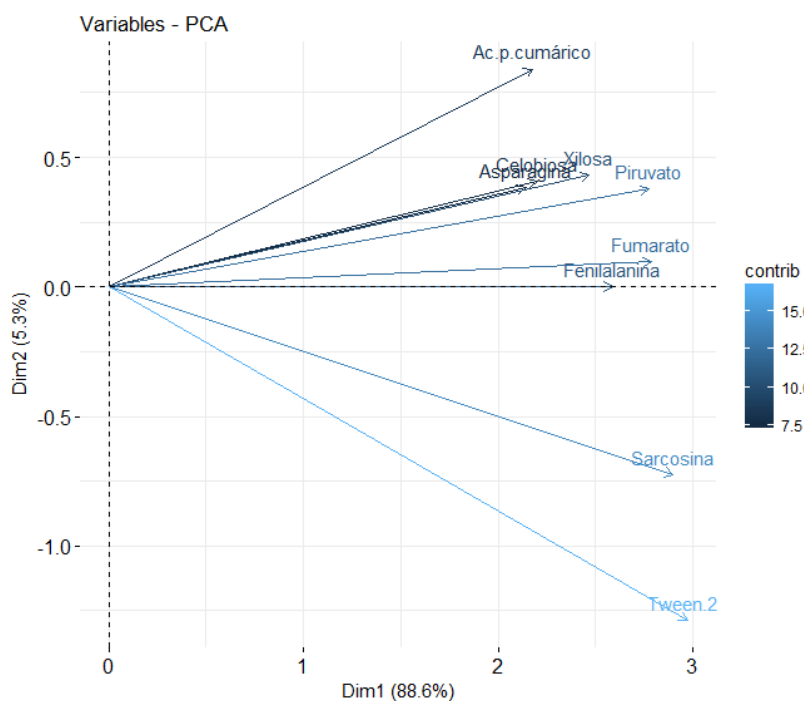


Figura 53. Contribución de las variables a las componentes principales 1 (CP1) y 2 (CP2) expresadas en forma de gradiente.

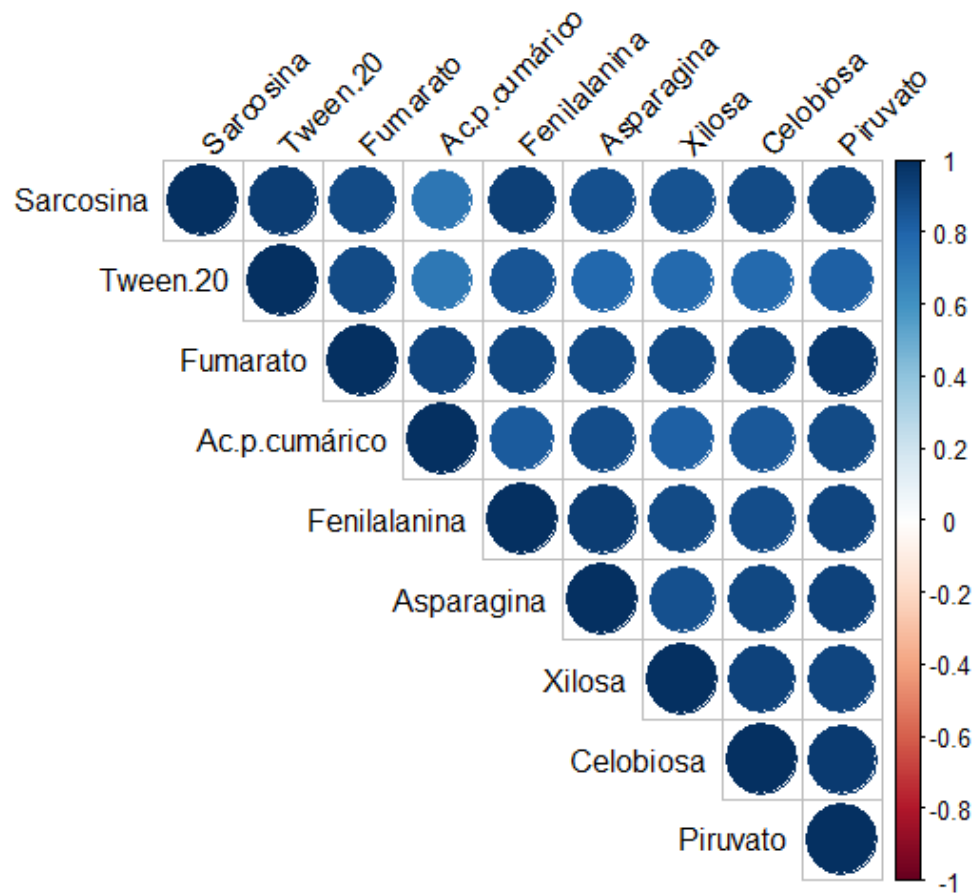


Figura 54. Correlación de las variables entre sí (matriz de correlaciones). Los valores de correlación se encuentran indicados en forma de gradiente de color.

	Fen	Asp	Sar	Cel	Xil	Pir	Fum	Cum	Tween 20
Fen	1								
Asp	0,94	1							
Sar	0,93	0,87	1						
Cel	0,88	0,9	0,89	1					
Xil	0,89	0,87	0,86	0,92	1				
Pir	0,91	0,92	0,9	0,95	0,91	1			
Fum	0,9	0,89	0,89	0,9	0,89	0,95	1		
Cum	0,83	0,88	0,72	0,84	0,82	0,89	0,91	1	
Tween 20	0,85	0,78	0,94	0,77	0,77	0,82	0,89	0,71	1

Tabla 57. Matriz de correlación de las variables fisiológicas. Fen= L-fenilalanina; Asp= L-asparagina; Sar= sarcosina; Cel= D-celobiosa; Xil= D-xilosa; Pir= ácido pirúvico; Fum= ácido fumárico; Cum= ácido *p*-cumárico.

Tabla 58. Estadísticas de tamaño del efecto (*DP* y *RP*) de los distintos fila bacterianos a los 4 días post-tratamiento. La categoría “*Unclassified*” corresponde a secuencias bacterianas sin asignación taxonómica. La relación de proporciones (*RP*) corresponde a la relación entre la abundancia de mayor y de menor magnitud. La diferencia de proporciones (*DP*) corresponde a la abundancia relativa en el método de corte menos la abundancia relativa en el método con glifosato.

Filo	Diferencia de proporciones (<i>DP</i>) (%)	Relación de proporciones (<i>RP</i>)
<i>Proteobacteria</i>	0,21	1,00
<i>Bacteroidetes</i>	0,11	1,01
<i>Acidobacteria</i>	-0,09	1,01
<i>Nitrospirae</i>	0,59	1,10
<i>Actinobacteria</i>	0,55	1,10
<i>Firmicutes</i>	-0,92	1,20
<i>Unclassified</i>	-0,25	1,08
<i>Planctomycetes</i>	-0,09	1,04
<i>Chloroflexi</i>	0,00	1,00
<i>Nitrospinae</i>	0,06	1,23
<i>Verrucomicrobia</i>	-0,15	2,14

Tabla 59. Estadísticas de tamaño del efecto (*DP* y *RP*) de los distintos fila bacterianos a los 26 días post-tratamiento. La categoría “*Unclassified*” corresponde a secuencias bacterianas sin asignación taxonómica. La relación de proporciones (*RP*) corresponde a la relación entre la abundancia de mayor y de menor magnitud. La diferencia de proporciones (*DP*) corresponde a la abundancia relativa en el método de corte menos la abundancia en el método con glifosato.

Filo	Diferencia de proporciones (<i>DP</i>) (%)	Relación de proporciones (<i>RP</i>)
<i>Proteobacteria</i>	-0,89	1,02
<i>Bacteroidetes</i>	-1,96	1,20
<i>Firmicutes</i>	0,66	1,08
<i>Actinobacteria</i>	0,91	1,14
<i>Nitrospirae</i>	1,62	1,31
<i>Acidobacteria</i>	-1,87	1,39
<i>Unclassified</i>	0,57	1,21
<i>Planctomycetes</i>	-0,06	1,03
<i>Chloroflexi</i>	0,11	1,08
<i>Verrucomicrobia</i>	0,89	8,83
<i>Nitrospinae</i>	0,02	1,07

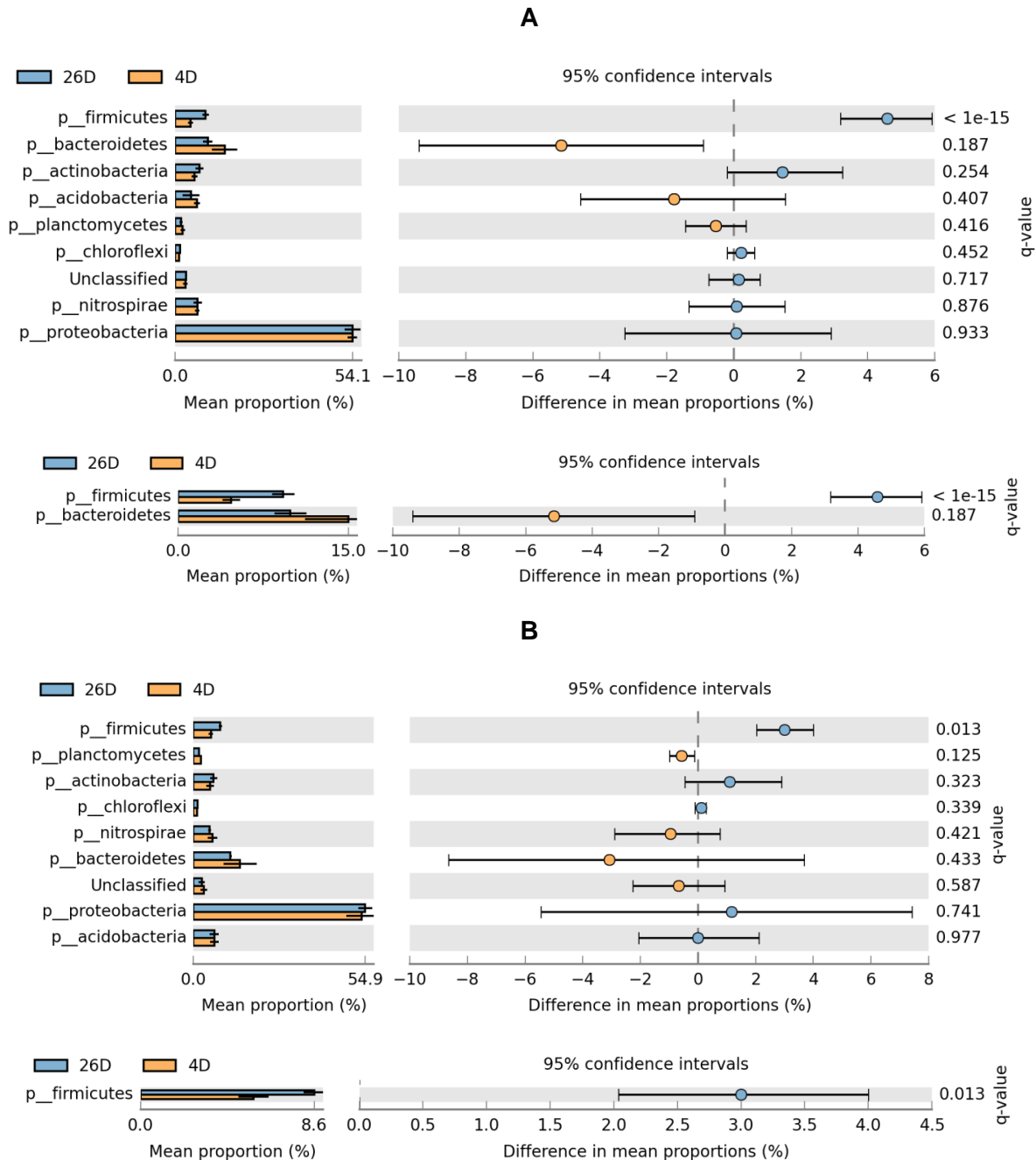


Figura 55. Análisis comparativo de los distintos fila bacterianos entre 4 días (4D, naranja) y 26 días (26D, azul) post-tratamiento para cada método de finalización: corte (A) y glifosato (B). El análisis se realizó mediante el software STAMP utilizando un test-t no paramétrico (*White's t-test*) a un nivel de significación del 5%. Sólo se consideraron las categorías con un mínimo de cinco secuencias. En cada caso, el panel superior corresponde a los resultados sin filtro de tamaño del efecto y el inferior a aquellos con filtro, de posible relevancia biológica ($DP > 1,5\%$; $RP > 1,5$). La categoría "Unclassified" corresponde a secuencias bacterianas sin asignación taxonómica. Los valores de probabilidad asociada se encuentran indicados como *q-value*. Se indican también los intervalos de confianza en cada comparación.

ANEXO

Tabla 60. Abundancia relativa (%) de las distintas clases bacterianas a los 4 días post-tratamiento. Sólo se indican las categorías con un mínimo de 5 secuencias. La categoría “*Unclassified*” corresponde a secuencias bacterianas sin asignación taxonómica.

Clase	Corte: abundancia relativa (%)	Corte: error estándar (%)	Glifosato: abundancia relativa (%)	Glifosato: error estándar (%)	Abundancia relativa (promedio de ambos métodos)
<i>Unclassified</i>	22,97	0,71	23,37	1,75	23,17
<i>Alphaproteobacteria</i>	18,08	2,00	14,99	1,54	16,53
<i>Gammaproteobacteria</i>	14,97	1,84	12,51	0,93	13,74
<i>Flavobacteriia</i>	11,66	1,30	11,70	2,23	11,68
<i>Betaproteobacteria</i>	8,27	0,39	13,93	1,71	11,10
<i>Deltaproteobacteria</i>	10,23	0,48	9,63	0,75	9,93
<i>Nitrospira</i>	5,21	0,55	5,15	0,91	5,18
<i>Bacilli</i>	3,19	0,52	4,19	0,18	3,69
<i>Actinobacteria</i>	3,21	0,26	2,74	0,55	2,97
<i>Thermomicrobia</i>	0,81	0,11	0,64	0,02	0,73
<i>Clostridia</i>	0,64	0,10	0,40	0,03	0,52
<i>Planctomycetia</i>	0,45	0,07	0,38	0,06	0,42

Tabla 61. Estadísticas de tamaño del efecto (*DP* y *RP*) de las distintas clases bacterianas los 4 días post-tratamiento. La categoría “*Unclassified*” corresponde a secuencias bacterianas sin asignación taxonómica. La relación de proporciones (*RP*) corresponde a la relación entre la abundancia de mayor y de menor magnitud. La diferencia de proporciones (*DP*) corresponde a la abundancia en el método de corte menos la abundancia en el método con glifosato.

Clase	Filo	Diferencia de proporciones (<i>DP</i>) (%)	Relación de proporciones (<i>RP</i>)
<i>Unclassified</i>	<i>Unclassified</i>	-0,40	1,02
<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	3,10	1,21
<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	2,45	1,20
<i>Flavobacteriia</i>	<i>Bacteroidetes</i>	-0,04	1,00
<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	-5,66	1,68
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	0,60	1,06
<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrospirae</i>	0,06	1,01
<i>Bacilli</i>	<i>Firmicutes</i>	-1,00	1,17
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	0,47	1,31
<i>Thermomicrobia</i>	<i>Chloroflexi</i>	0,17	1,26
<i>Clostridia</i>	<i>Firmicutes</i>	0,25	1,62
<i>Planctomycetia</i>	<i>Planctomycetes</i>	0,08	1,20

ANEXO

Tabla 62. Abundancia relativa (%) de las distintas clases bacterianas a los 26 días post-tratamiento. Sólo se indican las categorías con un mínimo de 5 secuencias. La categoría “*Unclassified*” corresponde a secuencias bacterianas sin asignación taxonómica.

Clase	Corte: abundancia relativa (%)	Corte: error estándar (%)	Glifosato: abundancia relativa (%)	Glifosato: error estándar (%)	Abundancia relativa (promedio de ambos métodos)
<i>Unclassified</i>	26,18	0,41	21,40	1,59	23,79
<i>Gammaproteobacteria</i>	15,63	2,45	14,35	1,90	14,99
<i>Betaproteobacteria</i>	11,85	1,17	14,29	0,63	13,07
<i>Alphaproteobacteria</i>	10,97	0,60	14,23	1,48	12,60
<i>Flavobacteriia</i>	7,97	0,79	9,91	0,24	8,94
<i>Deltaproteobacteria</i>	8,44	0,66	7,76	0,35	8,10
<i>Nitrospira</i>	6,61	0,77	4,87	0,24	5,74
<i>Bacilli</i>	4,40	0,76	6,80	0,29	5,60
<i>Actinobacteria</i>	4,59	0,79	4,13	0,62	4,36
<i>Thermomicrobia</i>	1,04	0,13	0,89	0,04	0,96

Tabla 63. Estadísticas de tamaño del efecto (*DP* y *RP*) de las distintas clases bacterianas los 26 días post-tratamiento. La categoría “*Unclassified*” corresponde a secuencias bacterianas sin asignación taxonómica. La relación de proporciones (*RP*) corresponde a la relación entre la abundancia de mayor y de menor magnitud. La diferencia de proporciones (*DP*) corresponde a la abundancia en el método de corte menos la abundancia en el método con glifosato.

Clase	Filo	Diferencia de proporciones (<i>DP</i>) (%)	Relación de proporciones (<i>RP</i>)
<i>Unclassified</i>	<i>Unclassified</i>	4,78	1,22
<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	1,28	1,09
<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	-2,43	1,21
<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	-3,27	1,30
<i>Flavobacteriia</i>	<i>Bacteroidetes</i>	-1,94	1,24
<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	0,68	1,09
<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrospirae</i>	1,74	1,36
<i>Bacilli</i>	<i>Firmicutes</i>	-2,40	1,55
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	0,45	1,11
<i>Thermomicrobia</i>	<i>Chloroflexi</i>	0,15	1,17

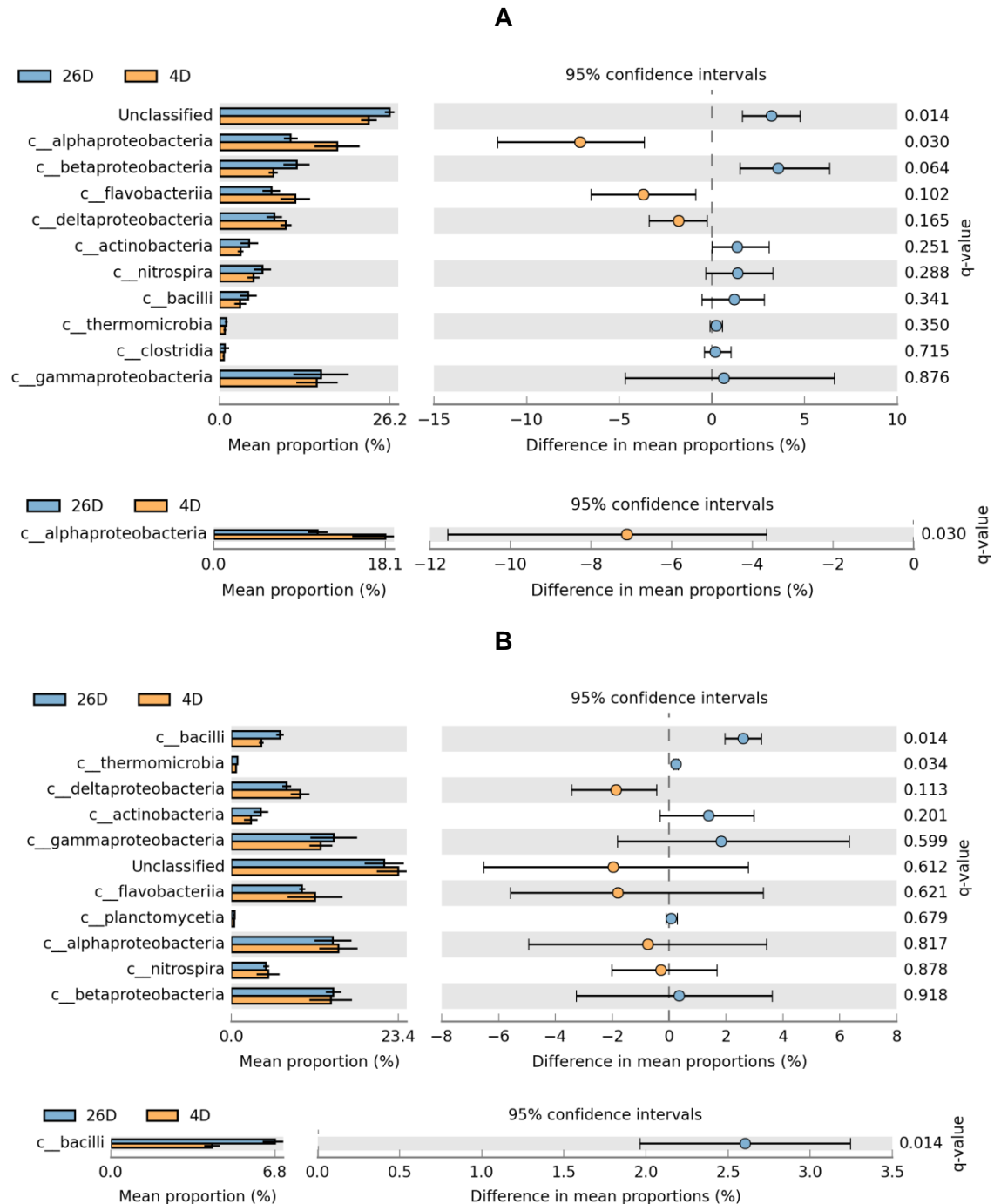


Figura 56. Análisis comparativo de las distintas clases bacterianas entre 4 días (4D, naranja) y 26 días (26D, azul) post-tratamiento para cada método de finalización: corte (A) y glifosato (B). El análisis se realizó mediante el software STAMP utilizando un test-t no paramétrico (*White's t-test*) a un nivel de significación del 5%. Sólo se consideraron las categorías con un mínimo de cinco secuencias. En cada caso, el panel superior corresponde a los resultados sin filtro de tamaño del efecto y el inferior a aquellos con filtro, de posible relevancia biológica ($DP > 1,5\%$; $RP > 1,5$). La categoría "Unclassified" corresponde a secuencias bacterianas sin asignación taxonómica. Los valores de probabilidad asociada se encuentran indicados como *q-value*. Se indican también los intervalos de confianza en cada comparación.

ANEXO

Tabla 64. Abundancia relativa (%) de los distintos órdenes bacterianos a los 4 días post-tratamiento. Sólo se indican las categorías con un mínimo de 5 secuencias. La categoría “*Unclassified*” corresponde a secuencias bacterianas sin asignación taxonómica.

Orden	Corte: abundancia relativa (%)	Corte: error estándar (%)	Glifosato: abundancia relativa (%)	Glifosato: error estándar (%)	Abundancia relativa (promedio de ambos métodos)
<i>Unclassified</i>	25,76	0,75	26,58	1,84	26,17
<i>Rhizobiales</i>	16,14	1,76	13,08	1,67	14,61
<i>Flavobacteriales</i>	11,66	1,30	11,70	2,23	11,68
<i>Desulfovibrionales</i>	6,93	0,72	6,34	0,36	6,63
<i>Nitrospirales</i>	5,21	0,55	5,15	0,91	5,18
<i>Burkholderiales</i>	3,00	0,46	6,34	1,28	4,67
<i>Chromatiales</i>	4,11	0,66	4,04	0,66	4,08
<i>Xanthomonadales</i>	4,06	0,93	3,91	1,02	3,98
<i>Bacillales</i>	3,19	0,52	4,19	0,18	3,69
<i>Actinomycetales</i>	3,21	0,26	2,74	0,55	2,97
<i>Nitrosomonadales</i>	2,55	0,05	2,96	0,66	2,76
<i>Syntrophobacterales</i>	2,83	0,32	2,57	0,46	2,70
<i>Pseudomonadales</i>	2,42	0,47	2,74	0,58	2,58
<i>Rhodobacterales</i>	1,94	0,30	1,91	0,56	1,93
<i>Oceanospirillales</i>	1,53	0,23	1,47	0,15	1,50
<i>Gallionellales</i>	0,36	0,02	1,62	0,91	0,99
<i>Sphaerobacterales</i>	0,81	0,11	0,64	0,02	0,73
<i>Clostridiales</i>	0,64	0,10	0,40	0,03	0,52
<i>Planctomycetales</i>	0,45	0,07	0,38	0,06	0,42

Tabla 65. Estadísticas de tamaño del efecto (*DP* y *RP*) de los distintos órdenes bacterianos los 4 días post-tratamiento. La categoría “*Unclassified*” corresponde a secuencias bacterianas sin asignación taxonómica. La relación de proporciones (*RP*) corresponde a la relación entre la abundancia de mayor y de menor magnitud. La diferencia de proporciones (*DP*) corresponde a la abundancia en el método de corte menos la abundancia en el método con glifosato.

Orden	Clase	Diferencia de proporciones (<i>DP</i>) (%)	Relación de proporciones (<i>RP</i>)
<i>Unclassified</i>	<i>Unclassified</i>	-0,81	1,03
<i>Rhizobiales</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	3,06	1,23
<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriia</i>	-0,04	1,00
<i>Desulfovibrionales</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>	0,59	1,09
<i>Nitrospirales</i>	<i>Nitrospirae</i>	0,06	1,01
<i>Burkholderiales</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	-3,34	2,11
<i>Chromatiales</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	0,08	1,02
<i>Xanthomonadales</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	0,15	1,04
<i>Bacillales</i>	<i>Bacilli</i>	-1,00	1,31
<i>Actinomycetales</i>	<i>Actinobacteria</i>	0,47	1,17
<i>Nitrosomonadales</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	-0,42	1,16
<i>Syntrophobacterales</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>	0,26	1,10
<i>Pseudomonadales</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	-0,32	1,13
<i>Rhodobacterales</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	0,04	1,02
<i>Oceanospirillales</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	0,06	1,04
<i>Gallionellales</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	-1,26	4,53
<i>Sphaerobacterales</i>	<i>Thermomicrobia</i>	0,17	1,26
<i>Clostridiales</i>	<i>Clostridia</i>	0,25	1,62
<i>Planctomycetales</i>	<i>Planctomycetia</i>	0,08	1,20

ANEXO

Tabla 66. Abundancia relativa (%) de los distintos órdenes bacterianos a los 26 días post-tratamiento. Sólo se indican las categorías con un mínimo de 5 secuencias. La categoría “*Unclassified*” corresponde a secuencias bacterianas sin asignación taxonómica.

Orden	Corte: abundancia relativa (%)	Corte: error estándar (%)	Glifosato: abundancia relativa (%)	Glifosato: error estándar (%)	Abundancia relativa (promedio de ambos métodos)
<i>Unclassified</i>	29,99	0,68	26,22	1,98	28,10
<i>Rhizobiales</i>	8,89	0,64	11,10	0,33	9,99
<i>Flavobacteriales</i>	7,97	0,79	9,91	0,24	8,94
<i>Chromatiales</i>	6,66	0,54	5,36	0,44	6,01
<i>Nitrospirales</i>	6,61	0,77	4,87	0,24	5,74
<i>Bacillales</i>	4,40	0,76	6,80	0,29	5,60
<i>Desulfovibrionales</i>	5,64	0,45	5,06	0,12	5,35
<i>Burkholderiales</i>	5,12	0,69	4,93	0,81	5,02
<i>Actinomycetales</i>	4,59	0,79	4,13	0,62	4,36
<i>Xanthomonadales</i>	3,79	1,80	3,59	1,07	3,69
<i>Nitrosomonadales</i>	2,89	0,35	3,51	0,89	3,20
<i>Pseudomonadales</i>	3,15	0,39	3,10	1,04	3,12
<i>Rhodobacterales</i>	2,08	0,22	3,13	1,29	2,60
<i>Syntrophobacterales</i>	2,36	0,16	2,28	0,20	2,32
<i>Oceanospirillales</i>	0,92	0,20	1,19	0,14	1,06
<i>Sphaerobacterales</i>	1,04	0,13	0,89	0,04	0,96
<i>Enterobacterales</i>	0,77	0,19	0,89	0,31	0,83

ANEXO

Tabla 67. Estadísticas de tamaño del efecto (*DP*, *RP*) y abundancia relativa promedio de los distintos órdenes bacterianos a los 26 días post-tratamiento. Sólo se indican las categorías con un mínimo de 5 secuencias. La categoría “*Unclassified*” corresponde a secuencias bacterianas sin asignación taxonómica.

Orden	Clase	Diferencia de proporciones (<i>DP</i>)	Relación de proporciones (<i>RP</i>)
<i>Unclassified</i>	<i>Unclassified</i>	3,78	1,14
<i>Rhizobiales</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	-2,21	1,25
<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriia</i>	-1,94	1,24
<i>Chromatiales</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	1,30	1,24
<i>Nitrospirales</i>	<i>Nitrospirae</i>	1,74	1,36
<i>Bacillales</i>	<i>Bacilli</i>	-2,40	1,55
<i>Desulfovibrionales</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>	0,59	1,12
<i>Burkholderiales</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	0,19	1,04
<i>Actinomycetales</i>	<i>Actinobacteria</i>	0,45	1,11
<i>Xanthomonadales</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	0,21	1,06
<i>Nitrosomonadales</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	-0,62	1,22
<i>Pseudomonadales</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	0,06	1,02
<i>Rhodobacterales</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	-1,06	1,51
<i>Syntrophobacterales</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>	0,08	1,03
<i>Oceanospirillales</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	-0,26	1,29
<i>Sphaerobacterales</i>	<i>Thermomicrobia</i>	0,15	1,17
<i>Enterobacteriales</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	-0,11	1,15

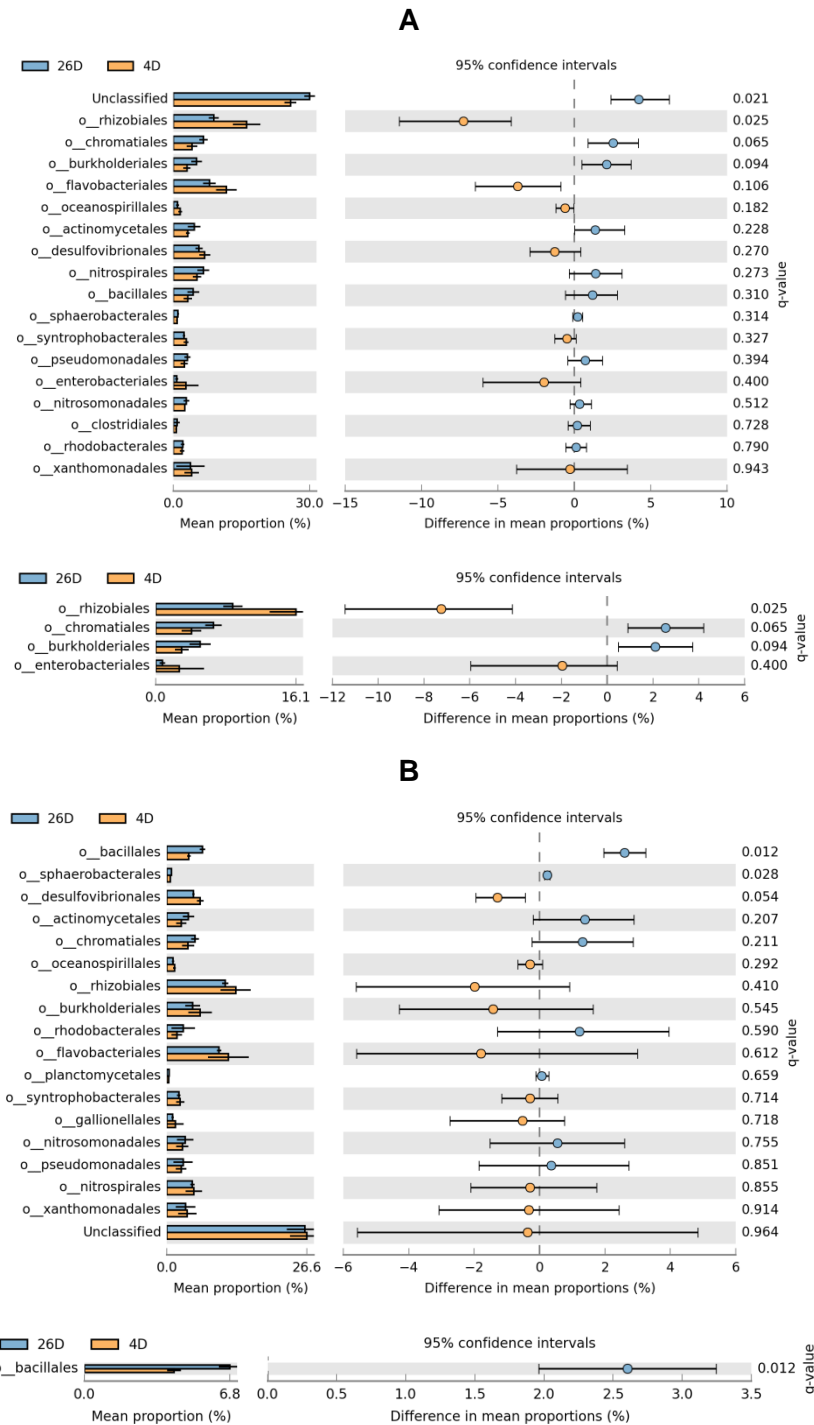


Figura 57. Análisis comparativo de los distintos órdenes bacterianos entre 4 días (4D, naranja) y 26 días (26D, azul) post-tratamiento para cada método de finalización: corte (A) y glifosato (B). El análisis se realizó mediante el software STAMP utilizando un test-t no paramétrico (*White's t-test*) a un nivel de significación del 5%. Sólo se consideraron las categorías con un mínimo de cinco secuencias. En cada caso, el panel superior corresponde a los resultados sin filtro de tamaño del efecto y el inferior a aquellos con filtro, de posible relevancia biológica ($DP > 1,5\%$; $RP > 1,5$). La categoría "Unclassified" corresponde a secuencias bacterianas sin asignación taxonómica. Los valores de probabilidad asociada se encuentran indicados como *q-value*. Se indican también los intervalos de confianza en cada comparación.

ANEXO

Tabla 68. Abundancia relativa (%) de las distintas familias bacterianas a los 4 días post-tratamiento. Sólo se indican las categorías con un mínimo de 5 secuencias. La categoría “*Unclassified*” corresponde a secuencias bacterianas sin asignación taxonómica. Se indica la media de cada método de finalización (corte, glifosato) y la abundancia promedio de ambos métodos.

Familia	Corte: abundancia relativa (%)	Corte: error estándar (%)	Glifosato: abundancia relativa (%)	Glifosato: error estándar (%)	Abundancia relativa (promedio de ambos métodos)
<i>Unclassified</i>	74,59	0,75	72,65	4,32	73,62
<i>Xanthomonadaceae</i>	3,96	0,96	3,83	1,03	3,90
<i>Flavobacteriaceae</i>	2,32	0,51	3,61	1,74	2,96
<i>Bradyrhizobiaceae</i>	2,98	0,91	2,25	0,41	2,61
<i>Brucellaceae</i>	3,17	0,25	2,02	0,25	2,60
<i>Comamonadaceae</i>	1,28	0,13	3,13	0,80	2,21
<i>Pseudomonadaceae</i>	1,59	0,51	2,15	0,68	1,87
<i>Nitrosomonadaceae</i>	1,60	0,11	2,02	0,39	1,81
<i>Cellulomonadaceae</i>	1,64	0,10	1,72	0,41	1,68
<i>Rhizobiaceae</i>	1,23	0,09	1,36	0,24	1,29
<i>Rhodobacteraceae</i>	1,26	0,28	1,13	0,40	1,20
<i>Gallionellaceae</i>	0,36	0,02	1,62	0,91	0,99
<i>Bacillaceae</i>	0,53	0,04	1,15	0,35	0,84

Tabla 69. Estadísticas de tamaño del efecto (DP, RP) de las distintas familias bacterianas a los 4 días post-tratamiento. Sólo se indican las categorías con un mínimo de 5 secuencias. La categoría “*Unclassified*” corresponde a secuencias bacterianas sin asignación taxonómica.

Familia	Orden	Diferencia de proporciones (DP)	Relación de proporciones (RP)
<i>Unclassified</i>	<i>Unclassified</i>	1,94	1,03
<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Xanthomonadales</i>	0,13	1,03
<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Flavobacteriales</i>	-1,28	1,55
<i>Bradyrhizobiaceae</i>	<i>Rhizobiales</i>	0,74	1,33
<i>Brucellaceae</i>	<i>Rhizobiales</i>	1,15	1,57
<i>Comamonadaceae</i>	<i>Burkholderiales</i>	-1,85	2,44
<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonadales</i>	-0,57	1,36
<i>Nitrosomonadaceae</i>	<i>Nitrosomonadales</i>	-0,42	1,26
<i>Cellulomonadaceae</i>	<i>Actinomycetales</i>	-0,08	1,05
<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Rhizobiales</i>	-0,13	1,11
<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Rhodobacterales</i>	0,13	1,12
<i>Gallionellaceae</i>	<i>Gallionellales</i>	-1,26	4,53
<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillales</i>	-0,62	2,18

ANEXO

Tabla 70. Abundancia relativa (%) de las distintas familias bacterianas a los 26 días post-tratamiento. Sólo se indican las categorías con un mínimo de 5 secuencias. La categoría “*Unclassified*” corresponde a secuencias bacterianas sin asignación taxonómica.

Familia	Corte: abundancia relativa media (%)	Corte: error estándar (%)	Glifosato: abundancia relativa media (%)	Glifosato: error estándar (%)	Abundancia relativa (promedio de ambos métodos) (%)
<i>Unclassified</i>	74,52	1,90	70,27	4,60	72,40
<i>Xanthomonadaceae</i>	3,72	1,82	3,59	1,07	3,65
<i>Comamonadaceae</i>	2,89	0,63	3,47	0,81	3,18
<i>Cellulomonadaceae</i>	2,85	0,83	2,38	0,35	2,61
<i>Bradyrhizobiaceae</i>	2,06	0,13	2,45	0,02	2,26
<i>Brucellaceae</i>	1,93	0,20	2,43	0,36	2,18
<i>Pseudomonadaceae</i>	1,72	0,28	1,96	0,96	1,84
<i>Nitrosomonadaceae</i>	1,45	0,48	2,17	0,59	1,81
<i>Flavobacteriaceae</i>	1,79	0,43	1,60	0,10	1,70
<i>Bacillaceae</i>	0,91	0,21	2,47	0,90	1,69
<i>Rhodobacteraceae</i>	0,83	0,06	2,55	1,18	1,69
<i>Rhizobiaceae</i>	1,30	0,31	1,34	0,33	1,32

Tabla 71. Estadísticas de tamaño del efecto (DP, RP) y abundancia relativa promedio de las distintas familias bacterianas a los 26 días post-tratamiento. Sólo se indican las categorías con un mínimo de 5 secuencias. La categoría “*Unclassified*” corresponde a secuencias bacterianas sin asignación taxonómica.. Sólo se indican las categorías con un mínimo de 5 secuencias. La categoría “*Unclassified*” corresponde a secuencias bacterianas sin asignación taxonómica.

Familia	Orden	Diferencia de proporciones (DP) (%)	Relación de proporciones (RP)
<i>Unclassified</i>	<i>Unclassified</i>	4,25	1,06
<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Xanthomonadales</i>	0,13	1,04
<i>Comamonadaceae</i>	<i>Burkholderiales</i>	-0,59	1,20
<i>Cellulomonadaceae</i>	<i>Actinomycetales</i>	0,47	1,20
<i>Bradyrhizobiaceae</i>	<i>Rhizobiales</i>	-0,40	1,19
<i>Brucellaceae</i>	<i>Rhizobiales</i>	-0,51	1,26
<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonadales</i>	-0,25	1,14
<i>Nitrosomonadaceae</i>	<i>Nitrosomonadales</i>	-0,72	1,49
<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Flavobacteriales</i>	0,19	1,12
<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillales</i>	-1,57	2,73
<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Rhodobacterales</i>	-1,72	3,07
<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Rhizobiales</i>	-0,04	1,03

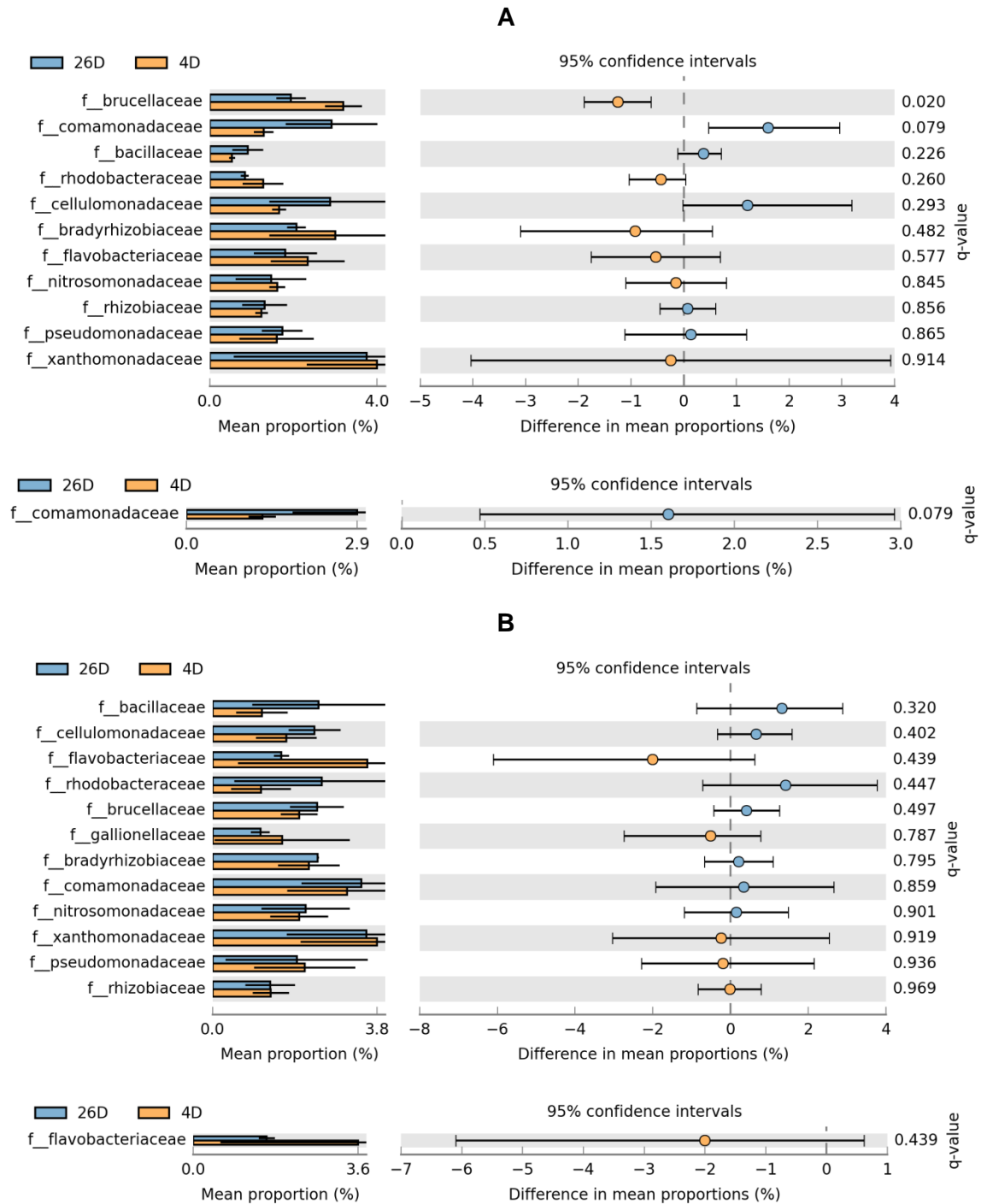


Figura 58. Análisis comparativo de las distintas familias bacterianas entre 4 días (4D, naranja) y 26 días (26D, azul) post-tratamiento para cada método de finalización: corte (A) y glifosato (B). El análisis se realizó mediante el software STAMP utilizando un test-t no paramétrico (*White's t-test*) a un nivel de significación del 5%. Sólo se consideraron las categorías con un mínimo de cinco secuencias. En cada caso, el panel superior corresponde a los resultados sin filtro de tamaño del efecto y el inferior a aquellos con filtro, de posible relevancia biológica ($DP > 1,5\%$; $RP > 1,5$). La categoría "Unclassified" corresponde a secuencias bacterianas sin asignación taxonómica. Los valores de probabilidad asociada se encuentran indicados como *q-value*. Se indican también los intervalos de confianza en cada comparación.

ANEXO

Tabla 72. Valores de C_t correspondientes a las distintas muestras analizadas mediante PCR cuantitativa (qPCR) del gen *korB*. Los altos valores, similares al del control negativo, o la ausencia de valores registrados en la PCR (-) indican resultados negativos (cantidades por debajo del límite de detección).

Muestra	Método (M)	Fecha (S)	Tratamiento (M×S)	Parámetro C_t
C1.4D	Corte (C)	4 días (4D)	C.4D	-
C2.4D	Corte (C)	4 días (4D)	C.4D	-
C3.4D	Corte (C)	4 días(4D)	C.4D	-
C4.4D	Corte (C)	4 días (4D)	C.4D	-
G1.4D	Glifosato (G)	4 días (4D)	G.4D	33,02
G2.4D	Glifosato (G)	4 días (4D)	G.4D	-
G3.4D	Glifosato (G)	4 días (4D)	G.4D	-
G4.4D	Glifosato (G)	4 días (4D)	G.4D	38,05
C1.10D	Corte (C)	10 días (10D)	C.10D	-
C2.10D	Corte (C)	10 días (10D)	C.10D	37,50
C3.10D	Corte (C)	10 días (10D)	C.10D	-
C4.10D	Corte (C)	10 días (10D)	C.10D	38,83
G1.10D	Glifosato (G)	10 días (10D)	G.10D	-
G2.10D	Glifosato (G)	10 días (10D)	G.10D	-
G3.10D	Glifosato (G)	10 días (10D)	G.10D	-
G4.10D	Glifosato (G)	10 días (10D)	G.10D	-
C1.17D	Corte (C)	17 días (17D)	C.17D	-
C2.17D	Corte (C)	17 días (17D)	C.17D	-
C3.17D	Corte (C)	17 días (17D)	C.17D	34,48
C4.17D	Corte (C)	17 días (17D)	C.17D	34,27
G1.17D	Glifosato (G)	17 días (17D)	G.17D	-
G2.17D	Glifosato (G)	17 días (17D)	G.17D	-
G3.17D	Glifosato (G)	17 días (17D)	G.17D	-
G4.17D	Glifosato (G)	17 días (17D)	G.17D	-
C1.26D	Corte (C)	26 días (26D)	C.26D	-
C2.26D	Corte (C)	26 días (26D)	C.26D	-
C3.26D	Corte (C)	26 días (26D)	C.26D	-
C4.26D	Corte (C)	26 días (26D)	C.26D	-
G1.26D	Glifosato (G)	26 días (26D)	G.26D	-
G2.26D	Glifosato (G)	26 días (26D)	G.26D	-
G3.26D	Glifosato (G)	26 días (26D)	G.26D	-
G4.26D	Glifosato (G)	26 días (26D)	G.26D	-
Control negativo	-	-	-	37,24

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamczyk, M., Jagura-Burdzy, G. (2003). Spread and survival of promiscuous IncP-1 plasmids. *Acta Biochimica Polonica* **50**, 425–453.
- Ahemad, M., Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University-Science* **20**, 1–20.
- Ainsworth, T.D., Krause, L., Bridge, T., Torda, G., Raina, J.B., Zakrzewski, M., Gates, R.D., Padilla-Gamino, J.L., Spalding, H.L., Smith, C., Woolsey, E.S., Bourne, D.G., Bongaerts, P., Hoegh-Guldberg, O., Leggat, W. (2015). The coral core microbiome identifies rare bacterial taxa as ubiquitous endosymbionts. *The ISME Journal* **9**, 2261–2274.
- Al-Rajab, A. J.; Amellal, S.; Schiavon, M. (2008). Sorption and leaching of ¹⁴C-glyphosate in agricultural soils. *Agronomic for Sustainable Development* **28**, 419–428.
- Allegrini, M., Zabaloy, M.C., Gómez, E. (2015). Ecotoxicological assessment of soil microbial community tolerance to glyphosate. *Science of the Total Environment* **533**, 60–68.
- Allegrini, M., Gómez, E., Zabaloy, M.C. (2017). Repeated glyphosate exposure induces shifts in nitrifying communities and metabolism of phenylpropanoids. *Soil Biology and Biochemistry* **105**, 206–215.
- Allison, S.D., Martiny, J.B.H. (2008). Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the U.S.A.* **105**, 11512–11519.
- Aminov, R.I. (2009). The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environmental Microbiology* **11(12)**, 2970–2988.
- Anandan, R., Dharumadurai, D., Manogaran, G.P. (2016). An Introduction to *Actinobacteria*. En: Dhanasekaran, D., Jiang, Y., (eds). *Actinobacteria: Basics and Biotechnological Applications*. Intech, Rijeka. Pp. 3–37.
- Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1978). A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soil. *Soil Biology and Biochemistry* **10**, 215–221.
- Anderson, J.P.E., Domsch K. H. (1993). The metabolic quotient for CO₂ (qCO₂) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. *Soil Biology and Biochemistry* **25**, 393–395.
- Anderson, T.H. (1994). Physiological analysis of microbial communities in soil: application and limitation. En: Ritz, K., Dighton, J., Giller, K.E. (Eds.). *Beyond the Biomass*. Wiley, Chichester, pp. 67–76.
- Anderson, M.J. (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology* **26**, 32–46.
- Anderson, T.H. (2003). Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **98**, 285–293.
- Anjum, R., Grohmann, E., Malik, A. (2011). Molecular characterization of conjugative plasmids in pesticide tolerant and multi-resistant bacterial isolates from contaminated alluvial soil. *Chemosphere* **84**, 175–181.
- Anzai Y, Kim H, Park J, Wakabayashi, H., Oyaizu H, (2000). Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**, 1563–1589.
- Arango, L., Buddrus-Schiemann, K., Opelt, K., Lueders, T., Haesler, F., Schmid, M., Ernst, D., Hartmann, A. (2014). Effects of glyphosate on the bacterial community associated with roots of transgenic Roundup Ready® soybean. *European Journal of Soil Biology* **63**, 41–48.
- Avrahami, S., Conrad, R., Braker, G. (2002). Effect of soil ammonium concentration on N₂O release and on the community structure of ammonia oxidizers and denitrifiers. *Applied Environmental Microbiology* **68**, 5685–5692.
- Azarbad, H., A.M. van Gestel, C., Niklinska, M., Laskowski, R., Röling, W.F.M, van Straalen, N.M. (2016). Resilience of Soil Microbial Communities to Metals and Additional Stressors: DNA-Based Approaches for Assessing “Stress-on-Stress” Responses. *International Journal of Molecular Sciences* **17**, 933.

- Babujia, L.C., Silva, A.P., Nakatani, A.S., Cantao, M.E., Vasconcelos, A.T.R., Visentainer, J.V., *et al.* (2016). Impact of long-term cropping of glyphosate-resistant transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] on soil microbiome. *Transgenic Research* **25**, 425–440.
- Badri, D.V., Vivanco, J.M. (2009). Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell and Environment* **32**, 666–681.
- Bahl, M.I., Burmølle, M., Meisner, A., Hansen, L.H., Sørensen, S.J. (2009). All IncP-1 plasmid subgroups, including the novel ϵ subgroup, are prevalent in the influent of a Danish wastewater treatment plant. *Plasmid* **62**, 134–139.
- Bardgett, R., Jones, A., Jones, D., Kemmitt, S., Cook, R., Hobbs, P., 2001. Soil microbial community patterns related to the history and intensity of grazing in sub-montane ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry* **33**, 1653–1664.
- Barraud, O., Baclet, M.C., Denis, F., Ploy, M.C. (2010). Quantitative multiplex real-time PCR for detecting class 1, 2 and 3 integrons. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **65**, 1642–1645.
- Barrios, E. (2007). Soil biota, ecosystem services and land productivity. *Ecological economics* **64**, 269–285.
- Barriuso, J., Marin, S., Mellado, R.P. (2011). Potential accumulative effect of the herbicide glyphosate on glyphosate-tolerant maize rhizobacterial communities over a three-year cultivation period. *PLoS ONE* **6** (11), e27558.
- Baude, J., Vial, L., Villard, C., Campillo, T., Lavire, C., Nesme, X., Hommais, F. (2016). Species-specific hydroxycinnamic acid degradation and siderophore biosynthesis pathways are regulated in a coordinated manner in *Agrobacterium fabrum*. *Applied Environmental Microbiology* **82**(12), 3515–3524.
- Beare, M.H., Coleman, D.C., Crossley, D.A., Hendrix, P.F., Odum, E.P. (1995). A hierarchical approach to evaluating the significance of soil biodiversity to biogeochemical cycling. *Plant and Soil* **170**, 5–22.
- Benbrook, C.M. (2016). Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environmental Science Europe* **28**, 3.
- Bender, E.A., Case, T.J., Gilpin, M.E. (1984). Perturbation experiments in community ecology: theory and practice. *Ecology* **65**, 1–13.
- Bending, G.D., Turner, M.K., Rayns, F., Marx, M.C., Wood, M. (2004). Microbial and biochemical soil quality indicators and their potential for differentiating areas under contrasting agricultural management regimes. *Soil Biology and Biochemistry* **36**, 1785–1792.
- Bennett, P.M. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology*, **153**, S347–S357.
- Berendsen, R.L., Pieterse, C.M.J., Bakker, P.A. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science* **17**, 478–486.
- Berg, G., Smalla, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology* **68**, 1–13.
- Bergmann, G.T., Bates, S.T., Eilers, K.G., Lauber, C.L., Caporaso, J.G., Walters, W.A. *et al.* (2011). The under-recognized dominance of *Verrucomicrobia* in soil bacterial communities. *Soil Biology and Biochemistry* **43**, 1450–1455.
- Blanck, H., Wängberg, S.A., Molander, S. (1988). Pollution-induced community tolerance: a new ecotoxicological tool. En: Cairns, J.J., Pratt, J.R. (Eds.). Functional testing of aquatic biota for estimating hazards of chemicals. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA, pp. 219–230.
- Blanck, H. (2002). A critical review of procedures and approaches used for assessing Pollution-Induced Community Tolerance (PICT) in biotic communities. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* **8**(5), 1003–1034.
- Blum, U., Shafer, S.R. (1988). Microbial populations and phenolic acids in soil. *Soil Biology and Biochemistry* **20**(6), 793–800.
- Boivin, M.E.Y., Breure, A.M., Posthuma, L., Rutgers, M. (2002). Determination of field effects of contaminants: significance of pollution-induced community tolerance. *Human and Ecological Risk Assessment* **8**, 1035–1055.

BIBLIOGRAFÍA

- Borics, G., Várbíró, G., Padisák, J. (2013). Disturbance and stress: different meanings in ecological dynamics? *Hydrobiologia* **711**, 1–7.
- Botha, A. (2006). Yeast in soil. En: Rosa, C.A., Péter, G. (Eds.), *The Yeast Handbook; Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 221–240.
- Botha, A. (2011). The importance and ecology of yeasts in soil. *Soil Biology and Biochemistry* **43**, 1–8.
- Bott, S., Tesfamariam, T., Kania, A., Eman, B., Aslan, N., Römheld V., *et al.* (2011). Phytotoxicity of glyphosate soil residues re-mobilised by phosphate fertilization. *Plant and Soil* **342**, 249–263.
- Bressan, M., Mougel, C., Dequiedt, S. (2008). Response of soil bacterial community structure to successive perturbations of different types and intensities. *Environmental Microbiology* **10**, 2184–2187.
- Brohon, B., Delolme, C., Gourdon, R. (2001). Complementarity of bioassays and microbial activity measurements for the evaluation of hydrocarbon-contaminated soils quality. *Soil Biology and Biochemistry* **33**, 883–891.
- Bugbee, B. (2008). Estimation of Soil Respiration: Improved Techniques for Measurement of Soil Gas. Disponible online: http://www.apogeeinstruments.com/content/O2_Sensor_Soil_Respiration.pdf
- Bugg, T.D.H., Ahmad, M., Hardiman, E.M., Rahman, R. (2011). Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. *Natural Product Reports* **28**, 1883–1896.
- Busse, M., Ratcliff, A., Shestak, C., Powers, R. (2001). Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* **33**, 1777–1789.
- Bustamante, M., Verdejo, V., Zúñiga, C., Espinosa, F., Orlando, J., Carú, M. (2012). Comparison of water availability effect on ammonia-oxidizing bacteria and archaea in microcosms of a Chilean semiarid soil. *Frontiers in Microbiology* **3**, 282.
- Calabrese, E.J. (2005). Paradigm lost, paradigm found: the re-emergence of hormesis as a fundamental dose response model in the toxicological sciences. *Environmental Pollution* **138**, 378–411.
- Calabrese, E.J. (2009). Hormesis: a conversation with a critic. *Environmental Health Perspectives* **117**(9), 1339–1343.
- Carfagno, P., Eiza, M., Babinec, F., Quiroga, A. (2012). Inclusión de cultivos de cobertura en la dinámica hídrica de hapludoles y haplustoles del oeste de la provincia de Buenos Aires y noreste de La Pampa. En: Quiroga, A., Bodrero, M. (Eds.), *Contribuciones de Los Cultivos de Cobertura a La Sostenibilidad de Los Sistemas de Producción*. INTA, Anguil, p. 170.
- Cedergreen, N., Streibig, J.C. (2005). The toxicity of herbicides to non target aquatic plants and algae: assessment of predictive factors and hazard. *Pest Management Science* **61**, 1152–1160.
- Cedergreen, N. (2008). Is the growth stimulation by low doses of glyphosate sustained over time? *Environmental Pollution* **156**, 1099–1104.
- Cerdeira, A.L., Duke, S.O. (2006). The current status and environmental impacts of glyphosate-resistant crops. A review. *Journal of Environmental Quality* **35**, 1633–1658.
- Chander, K., Dyckmans, J., Hoepfer, H., Joergensen, R. G., Raubuch, M. (2001). Long-term effects on soil microbial properties of heavy metals from industrial exhaust deposition, *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **164**, 657–663.
- Chang, Y.J., Hussain, A.K.M.A., Stephen, J.R., Mullen, M.D., White, D.C., Peacock, A. (2001). Impact of herbicides on the abundance and structure of beta-subgroup ammonia oxidizer communities in soil microcosms. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**, 2462–2468.
- Chang, H-X., Haudenschild, J.S., Bowen, C.R., Hartman, G.L. (2017). Metagenome-Wide Association Study and Machine Learning Prediction of Bulk Soil Microbiome and Crop Productivity. *Frontiers in Microbiology* **8**, 519.
- Chao, A. (1984). Nonparametric-estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics* **11**, 265–270.

BIBLIOGRAFÍA

- Chavarría, D.N., Verdenelli, R.A., Muñoz, E.J., Conforto, C., Restovich, S.B., Andriulo, A.E., Meriles, J.M., Vargas-Gil, S. (2016). Soil microbial functionality in response to the inclusion of cover crop mixtures in agricultural systems. *Spanish Journal of Agricultural Research* **14**(2), e0304.
- Cheng, W., Zhang, Q., Coleman, D.C., Carroll, C.R., Hoffman, C.A. (1996). Is available carbon limiting microbial respiration in the rhizosphere? *Soil Biology and Biochemistry* **28**(10), 1283–1288.
- Chishaki, N., Horiguchi, T. (1997) Responses of secondary metabolism in plants to nutrient deficiency. *Soil Science & Plant Nutrition* **43**, 987–991.
- Chu, H., Fujii, T., Morimoto, S., Lin, X., Yagi, K., Hu, J., Zhang, J. (2007). Community structure of ammonia-oxidizing bacteria under long-term application of mineral fertilizer and organic manure in a sandy loam soil. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 485–491.
- Clayton, S.J., Clegg, C.D., Murray, P.J., Gregory, P.J. (2005). Determination of the impact of continuous defoliation of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* on bacterial and fungal community structure in rhizosphere soil. *Biology and Fertility of Soils* **41**, 109–115.
- Clements, W.H. (1999). Metal tolerance and predator-prey interactions in benthic macroinvertebrate stream communities. *Journal of Applied Ecology* **9**, 1073–1084.
- Clements, W.H., Rohr, J.R. (2009). Community responses to contaminants: using basic ecological principles to predict ecotoxicological effects. *Environmental Toxicology and Chemistry* **28**, 1789–1800.
- Cohan, F. M. (2002). What are bacterial species? *Annual Review of Microbiology* **56**, 457–487.
- Conti, M. (2000). Principios de Edafología con énfasis en suelos argentinos, Segunda Edición. Editorial Facultad de Agronomía, UBA.
- Conti, M.E. (2011). Introducción a la edafología. En: Conti, M.E y Giuffré, L. (Eds.). Edafología: bases y aplicaciones ambientales argentinas. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina. ISBN:978-950-29-1323-0, pp. 3-8.
- CONICET, Comisión Nacional de Investigación sobre Agroquímicos (2009). Informe de evaluación de la información científica existente vinculada a la incidencia del glifosato sobre la salud humana y el ambiente.
- Cook, R.J., Thomashow, L.S., Weller, D.M., Fujimoto, D., Mazzola, M., Bangera, Kim, D.S. (1995). Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the U.S.A.* **92**, 4197.
- Corbel, S., Mougin, C., Martin-Laurent, F., Crouzet, O., Bru, D., Nélieu, S., Bouaïcha, N. (2015). Evaluation of phytotoxicity and cotoxicity potentials of a cyanobacterial extract containing microcystins under realistic environmental concentrations and in a soil-plant system. *Chemosphere* **128**, 332–340.
- Costa, R., Götz, M., Mrotzek, N., Lottmann, J., Berg, G., Smalla, K. (2006). Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds. *FEMS Microbiology Ecology* **56**, 236–249.
- Coupland, D., J. C. Caseley. (1979). Presence of ^{14}C activity in root exudates and guttation fluid from *Agropyron repens* treated with ^{14}C -labeled glyphosate. *New Phytologist* **83**, 17–22.
- Cox, C., Surgan, M. (2006). Unidentified inert ingredients in pesticides: implications for human and environmental health. *Environmental Health Perspectives* **114**, 1803–1806.
- Damin, V., Trivelin, Paulo C.O., Carvalho, Saul J.P., Moraes, M.F., Barbosa, T.G. (2010). Herbicide application increases nitrogen (^{15}N) exudation and root detachment of *Brachiaria decumbens* Stapf. *Plant and Soil* **334**, 511–519.
- Dahlberg, C., Linberg, C., Torsvik, V.L., Hermansson, M. (1997). Conjugative plasmids isolated from bacteria in marine environments show various degrees of homology to each other and are not closely related to well-characterized plasmids. *Applied Environmental Microbiology* **63**, 4692–4697.
- Daniel, R. (2005). The metagenomics of soil. *Nature Reviews* **3**, 470–478.
- Davies, J., Spiegelman, G.B., Yim, G. (2006). The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Current Opinion in Microbiology* **9**, 445–453.

BIBLIOGRAFÍA

- Dealtry, S., Holmsgaard, P.N., Dunon, V., Jechalke, S., *et al.* (2014). Shifts in abundance and diversity of mobile genetic elements to diverse pesticides introduced into an on-farm biopurification system over a year. *Applied Environmental Microbiology* **80**(13), 4012.
- de Andrea, M.M., Peres, T.B., Luchini, L.C., Basarin, S., Papini, S., Matallo, M.B., *et al.* (2003). Influence of repeated applications of glyphosate on its persistence and soil bioactivity. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **38**, 1329–1335.
- DeAngelis, K.M., Lindow, S.E., Firestone, M.K. (2008). Bacterial quorum sensing and nitrogen cycling in rhizosphere soil. *FEMS Microbiology Ecology* **66**, 197–207.
- DeAngelis, K.M., Brodie, E.L., DeSantis, T.Z., Andersen, G.L., Lindow, S.E., Firestone M.K. (2009). Selective progressive response of soil microbial community to wild oat roots. *The ISME Journal* **3**, 168–178.
- Degens, B.P., Schipper, L.A., Sparling, G.P., Duncan, L.C. (2001). Is the microbial community in a soil with reduced catabolic diversity less resistant to stress or disturbance? *Soil Biology and Biochemistry* **33**, 1143–1153.
- Demoling, L.A., Bååth, E. (2008). Use of pollution-induced community tolerance of the bacterial community to detect phenol toxicity in soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* **27**(2), 334–340.
- Deni, J., Penninckx, M.J. (1999). Nitrification and autotrophic nitrifying bacteria in a hydrocarbon-polluted soil. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 4008–4013.
- Dennis, P.G., Miller, A.J., Hirsch, P.R. (2010). Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities? *FEMS Microbiology Ecology* **72**, 313–327.
- DeSantis, T.Z., Hugenholtz, P., Larsen, N.M.R., Brodie, E.L., Keller, K. *et al.* (2006). Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 5069–5072.
- Dias, A.C.F., Hoogwout, E.F., Pereira e Silva, M.C., Salles, J.F., van Overbeek, L.S., *et al.* (2012). Potato cultivar type affects the structure of ammonia oxidizer communities in field soil under potato beyond the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* **50**, 85–95.
- Dick, R.E., Quinn, J.P. (1995). Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **43**, 545–550.
- Dilly, O. (2005). Microbial energetics in soils. En: Buscot, F., Varma, A. (Eds.), *Soil Biology, Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions*, Vol. 3. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 123–138.
- Dion, H.M., Harsh, J.B., Hill, H.H. (2001). Competitive sorption between glyphosate and inorganic phosphate on clay minerals and low organic matter soils. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **249**, 385–390.
- Domsch, K.H., Jagnow, G., Anderson, K.-H., (1983). An ecological concept for the assessment of side-effects of agrochemicals on soil microorganisms. *Residue Reviews* **86**, 65–105.
- Doran, J.W., Parkin, T.B. (1994). Defining and assessing soil quality. En: J.W. Doran, D.C. Coleman, D.F. Bezdicsek y B.A. Stewart, eds. *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*. SSSA, Inc., Madison, Wisconsin, USA.
- Doran, J.W., Safley, M. (1997). Defining and assessing soil health and sustainable productivity. En: Pankhurst, C. *et al.* (eds.). *Biological indicators of soil health*. Wallingford, UK: CAB International. p. 1–28.
- Doublet, J., Mamy, L., Barriuso, E. (2009). Delayed degradation in soil of foliar herbicides glyphosate and sulcotrione previously absorbed by plants: Consequences on herbicide fate and risk assessment. *Chemosphere* **77**, 582–589.
- Dowd, S. E., T. R. Callaway, *et al.* (2008). Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *BMC Microbiology* **8**, 125.

- Dowd, S.E., Sun, Y. *et al.* (2008). Bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP) for microbiome studies: bacterial diversity in the ileum of newly weaned *Salmonella*-infected pigs. *Foodborne Pathogens and Disease* **5**(4), 459–472.
- Drenovsky, R.E., Elliot, G.N., Graham, K.J., Scow, K.M. (2004a). Comparison of phospholipid fatty acid (PLFA) and total soil fatty acid methyl esters (TSFAME) for characterizing soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* **36**, 1793–1800.
- Drenovsky, R.E., Vo, D., Graham, K.J., Scow, K.M. (2004b). Soil water content and organic carbon availability are major determinants of soil microbial community composition. *Microbial Ecology* **48**, 424–430.
- Druille, M., Cabello, M.N., García Parisi, P.A., Golluscio, R.A., Omacini, M. (2015). Glyphosate vulnerability explains changes in root-symbionts propagules viability in pampean grasslands. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **202**, 48–55.
- Duke, S.O., Hoagland, R.E. (1978). Effects of glyphosate on metabolism of phenolic compounds I. Induction of phenylalanine ammonia-lyase activity in dark-grown maize roots. *Plant Science Letters* **11**, 185–190.
- Duke, S.O., Hoagland, R.E., Elmore, C.D. (1980). Effects of glyphosate on metabolism of phenolic compounds V.L-aminooxy-phenylpropionic acid and glyphosate effects on phenylalanine ammonia-lyase in soybean seedlings. *Plant Physiology* **65**, 17–21.
- Duke, S.O., Cedergreen, N., Velini, E., Belz, R.G. (2006). Hormesis: is it an important factor in herbicide use and allelopathy? *Outlooks Pest Management* **17**(1), 29–33.
- Duke, S.O., Powles, S.B. (2008). Glyphosate: A once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science* **64**, 319–325.
- Duke, S.O., Lydon, J., Koskinen, W.C., Moorman, T.B., Chaney, R.L., Hammerschmidt, R. (2012). Glyphosate effects on plant mineral nutrition, crop rhizosphere microbiota, and plant disease in glyphosate-resistant crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**, 10375–10397.
- Dunon, V.S.K., Bers, K., Lavigne, R., Smalla, K., Springael, D. (2013). High prevalence of IncP-1 plasmids and IS1071 insertion sequences in on-farm biopurification systems and other pesticide polluted environments. *FEMS Microbiology Ecology* **86**(3), 415–431.
- Edgar, R.C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **26**(19), 2460–2461.
- EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues. (2016). Scientific Opinion Addressing the State of the Science on Risk Assessment of Plant Protection Products for In-soil Organisms, EFSA Journal. European Food Safety Authority, Parma. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2017.4690/epdf>.
- Egle, K., Römer, W., Keller, H. (2003). Exudation of low molecular weight organic acids by *Lupinus albus* L., *Lupinus angustifolius* L. and *Lupinus luteus* L. as affected by phosphorus supply. *Agronomie* **23**, 511–518.
- Eloe-Fadrosh, E.A., Ivanova, N.N., Woyke, T., Kyrpides, N.C. (2016). Metagenomics uncovers gaps in amplicon-based detection of microbial diversity. *Nature Microbiology* **1**, 15032.
- El-Tarabily, K.A., Sivasithamparam, K. (2006). Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biology and Biochemistry* **34**, 1–16.
- Emiliani, G., Fondi, M., Fani, R., Gribaldo, S. A horizontal gene transfer at the origin of phenylpropanoid metabolism: a key adaptation of plants to land. *Biology Direct* **4**, 7.
- Enwall, K., Philippot, L., Hallin, S. (2005). Activity and composition of the denitrifying bacterial community respond differently to long-term fertilization. *Applied Environmental Microbiology* **71**, 8335–8343.
- Estrada-de los Santos, P., Bustillos-Cristales, R.O., Caballero-Mellado, J. (2001). *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Applied Environmental Microbiology* **67**, 2790–2798.

BIBLIOGRAFÍA

- Estrada-de los Santos, P., Rojas-Rojas, F.U., Tapia-García, E.Y., *et al.* (2015). To split or not to split: an opinion on dividing the genus *Burkholderia*. *Annals of Microbiology* DOI: 10.1007/s13213-015-1183-1.
- Evans, S.E, Wallenstein, M.D. (2012). Soil microbial community response to drying and rewetting stress: does historical precipitation regime matter? *Biogeochemistry* **109**(1), 101–116.
- Farenhorst, A., Papiernik, S.K., Saiyed, I., Messing, P., Stephens, K.D., Schumacher, J.A., Lobb, D.A., Li, S., Lindstrom, M.J., Schumacher, T.E. (2008). Herbicide Sorption Coefficients in Relations to Soil Properties and Terrain Attributes on a Cultivated Prairie. *Journal of Environmental Quality* **37**, 1201–1208.
- Feld, L., Hjelmsø, M.H., Nielsen, M.S., Jacobsen, A.D., Rønn, R., Ekelund, F., Krogh, P.H., Strobel, B.W., Jacobsen, C.S. (2015). Pesticide side effects in an agricultural soil ecosystem as measured by amoA expression quantification and bacterial diversity changes. *PLoS ONE* **10**(5), e0126080.
- Fierer, N., Schimel, J. (2002). Effects of drying–rewetting frequency on soil carbon and nitrogen transformations. *Soil Biology and Biochemistry* **34**, 777–787.
- Fierer, N., Schimel, J.P., Holden, P.A. (2003). Influence of drying–rewetting frequency on soil bacterial community structure. *Microbial Ecology* **45**, 63–71.
- Fierer, N., Jackson, J.A., Vilgalys, R., Jackson, R.B. (2005). Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 4117–4120.
- Fierer, N., Carney, K.M., Horner–Devine, M.C., Megonigal, J.P. (2009). The biogeography of ammonia-oxidizing bacterial communities in soil. *Microbial Ecology* **58**, 435–445.
- Fierer, N., Lauber, C.L., Ramirez, K.S., Zaneveld, J., Bradford, M.A, Knight, R. (2012). Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. *The ISME Journal* **6**, 1007–1017.
- Fischer, R.S., Berry, A, Gaines, C.G., Jensen, R.A. (1986). Comparative action of glyphosate as a trigger of energy drain in *Eubacteria*. *Journal of Bacteriology* **168**, 1147–1154.
- Flemming, H-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature reviews* **14**, 563–575.
- Fomsgaard, I.S.; Spliid, N.H., Felding, G. (2003). Leaching of pesticides through normal-tillage soil—a lysimeter study. II. Glyphosate. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* **38**, 19–35.
- Franzluebbers, A.J., Hons, F.M., Zuberer, D.A. (1994). Long-term changes in soil carbon and nitrogen pools in wheat management systems. *Soil Science Society America Journal* **58**, 1639–1645.
- Freese, H.M., Eggert, A., Garland, J.L., Schumann, R. (2010). Substrate Utilization Profiles of Bacterial Strains in Plankton from the River Warnow, a Humic and Eutrophic River in North Germany. *Microbial Ecology* **59**(1), 59–75.
- Gallently, B.C., Blows, M.W., Marshall, D.J. (2007). Genetic mechanisms of pollution resistance in a marine invertebrate. *Applied Ecology* **17**, 2290–2297.
- Garbeva, P., van Veen, J.A., van Elsas, J.D. (2004). Microbial diversity in soil: Selection of Microbial Populations by Plant and Soil Type and Implications for Disease Suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology* **42**, 243–270.
- Garbeva, P., van Elsas, J.D., van Veen, J.A. (2008). Rhizosphere microbial community and its response to plant species and soil history. *Plant and Soil* **302**, 19–32.
- Garland, J.L., Mills, A.L. (1991). Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community level sole-carbon-source utilization. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 2351–2359.
- Garland, J.L., Roberts, M.S., Levine, L.H., Mills, A.L. (2003). Community-level physiological profiling using an oxygen-sensitive fluorophore in a microtiter plate. *Applied Environmental Microbiology* **69**, 2994–2998.

BIBLIOGRAFÍA

- Garland, J.L., Zabaloy, M.C., Birmele, M., Mackowiak, C.L., Lehman, M., Frey, S.D. (2012). Examining N-limited soil microbial activity using community-level physiological profiling based on O₂ consumption. *Soil Biology and Biochemistry* **47**, 46–52.
- GelCompar II™ v. 4.6 Software Manual, Applied Maths, Kortrijk Belgium. URL: <http://www.applied-maths.com/> (Fecha de último acceso: Mayo 2016).
- Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R. (2000). Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* **167**, 35–120.
- Gillings, M.R., Gaze, W.H., Pruden, A., Smalla, K., Tiedje, J.M., Zhu, Y.G. (2015). Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *The ISME Journal* **9(6)**, 1269–1279.
- Gimsing, A.L., Borggaard, O.K. (2002). Competitive adsorption and desorption of glyphosate and phosphate on clay silicates and oxides. *Clay Minerals* **37**, 509–515.
- Gimsing, A.L., Borggaard, O.K., Jacobsen, O.S., Aamand, J., Sørensen, J. (2004). Chemical and microbiological soil characteristics controlling glyphosate mineralization in Danish surface soils. *Applied Soil Ecology* **27(3)**, 233–242.
- Gjettermann, B., Petersen, C.T., Hansen, S., Bender Koch, S.C., Styczen, M. (2011). Kinetics of Glyphosate Desorption from Mobilized Soil Particles. *Soil Science Society of America Journal* **75(2)**, 434–43.
- Glass, R.L. (1987). Adsorption of glyphosate by soils and clay minerals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **35**, 497–500.
- Gleeson, D.B., Herrmann, A.M., Livesley, S.J., Murphy D.V. (2008). Influence of water potential on nitrification and structure of nitrifying bacterial communities in semiarid soils. *Applied Soil Ecology* **40**, 189–194.
- Gleeson, D.B., Müller, C., Banerjee, S., Ma, W., Siciliano, S.D., Murphy, D.V. (2010). Response of ammonia oxidizing archaea and bacteria to changing water filled pore space. *Soil Biology and Biochemistry* **42**, 1888–1891.
- Golubev, S.N., Schelud'ko, A.V., Muratova, A.Y., Makarov, O.E., Turkovskaya, O.V. (2008). Assessing the potential of rhizobacteria to survive under phenanthrene pollution. *Water, Air and Soil Pollution* **198(1–4)**, 5–16.
- Gomes, N.C.M., Heuer, H., Schonfeld, J., Costa, R., Mendonca-Hagler, L.C., Smalla, K. (2001). Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. *Plant and Soil* **232**, 167–180.
- Gomes, N.C.M., Kosheleva, I., Abraham, W.R., Smalla, K. (2005). Effects of the inoculant strain *Pseudomonas putida* KT2442 (pNF 142) and of naphthalene contaminations on the soil bacterial community. *FEMS Microbiology Ecology* **54**, 21–33.
- Gomes, M.P., Smedbol, E., Chalifour, A., Henault-Ethier, L., Labrecque, M., Lepage, L., Lucotte, M., Juneau, P. (2014). Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview. *Journal of Experimental Botany* **65(17)**, 4691–4703.
- Gómez, E., Bisaro, V., Conti, M. (2000). Potencial C-source utilization patterns of bacterial communities as influenced by clearing and land use in a vertic soil of Argentina. *Applied Soil Ecology* **15**, 273–281.
- Gómez, E., Garland, J., Conti, M. (2004). Reproducibility in the response of soil bacterial community-level physiological profiles from a land use intensification gradient. *Applied Soil Ecology* **26**, 21–30.
- Gómez, E., Ferreras, L., Lovotti, L., Fernández, E. (2009). Impact of glyphosate application on microbial biomass and metabolic activity in a Vertic Argiudoll from Argentina. *European Journal of Soil Biology* **45**, 163–167.
- Gong, P., Gasparrini, P., Rho, D., Hawari, J., Thiboutot, S., Ampleman, G., Sunahara, G.I. (2000). An *in Situ* respirometric technique to measure pollution-induced microbial community tolerance in soils contaminated with 2,4,6-trinitrotoluene. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **47**, 96–103.

- Govaerts, B., Mezzalama, M., Unno, Y., Sayer, K.D., Luna-Guido, M., Vanherck, K., Dendoovan, L., Deckers, J. (2007). Influence of tillage, residue management, and crop rotation on microbial biomass and catabolic diversity. *Applied Soil Ecology* **37**, 18–30.
- Green, S.J., Leigh, M.B., Neufeld, J.D. (2009). Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) for Microbial Community Analysis. En: Timmis, K.N. (Ed.), *Microbiology of Hydrocarbons, Oils, Lipids, and Derived Compounds*. Springer, Heidelberg, pp. 4137–4158.
- Griffiths, B.S. (2000). Ecosystem response of pasture soil communities to fumigation-induced microbial diversity reductions: an examination of the biodiversity-ecosystem function relationship. *Oikos* **90**, 279–294.
- Griffiths, B.S., Ritz, K., Wheatley, R.E., Kuan, H.L., Boag, B., Christensen, S., Ekelund, F., Sørensen, S., Muller, S., Bloem, J. (2001). An examination of the biodiversity-ecosystem function relationship in arable soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* **33**, 1713–1722.
- Griffiths, B. S., Philippot, L. (2012). Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. *FEMS Microbiology Reviews* **37**(2), 112–129.
- Griffiths, R.I., Whiteley, A.S., O'Donnell, A.G., Bailey, M.J. (2003). Physiological and community responses of established grassland bacterial populations to water stress. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 6961–6968.
- Grossbard, E. (1985). Effects of glyphosate on the microflora with reference to the decomposition of treated vegetation and interaction with some plant pathogens. En: Grossbard E, Atkinson D (eds) *The Herbicide Glyphosate*. Butterworths, London, pp 159–185.
- Guenzi, W.D., McCalla, T.M. (1966). Phenolic acids in oat, wheat, sorghum and corn residues and their phytotoxicity. *Agronomy Journal* **58**, 303–304.
- Guillet, G., Poupard, J., Basurco, J., De Luca, V. (2000). Expression of tryptophan decarboxylase and tyrosine decarboxylase genes in tobacco results in altered biochemical and physiological phenotypes. *Plant Physiology* **122**, 933–943.
- Handl, S., German, A.J., Holden, S.L., Dowd, S.E., Steiner, J.M., Heilmann, R.M., Grant, R.W., Swanson, K.S., Suchodolski, J.S. (2013). Faecal microbiota in lean and obese dogs. *FEMS Microbiology Ecology* **84**, 332–343.
- Haney, R.L., Senseman, S.A., Hons, F.M., Zuberer, D.A. (2000). Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. *Weed Science* **48**, 89–93.
- Haichar, F.E., Marol, C., Berge, O., Rangel-Castro, J.I., Prosser, J., Balesdent, J., Heulin, T., Achouak, W. (2008). Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *The ISME Journal* **2**, 1221–1230.
- Hart, M.R., Brookes, P.C. (1996). Soil microbial biomass and mineralization of soil organic matter after 19 years of cumulative field applications of pesticides. *Soil Biology and Biochemistry* **28**, 1641–1649.
- Hartmann, A., Schmid, M., van Tuinen, D., Berg, G. (2009). Plant-driven selection of microbes. *Plant and Soil* **321**, 235–257.
- Hastings, R.C., Butler, C., Singleton, I., Saunders, J.R., McCarthy, A.J. (2000). Analysis of ammonia-oxidizing bacteria populations in acid forest soil during conditions of moisture limitation. *Letters in Applied Microbiology* **30**, 14–18.
- Hendricks, C.W., Rhodes, A. N. (1992). Effect of glyphosate and nitrapyrin on selected bacterial populations in continuous-flow culture. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **49**, 417–424.
- Hernández, M., Jia, Z., Conrad, R., Seeger, M. (2011). Simazine application inhibits nitrification and changes the ammonia-oxidizing bacterial communities in a fertilized agricultural soil. *FEMS Microbiology Ecology* **78**, 511–518.
- Herrick, J.E. (2000). Soil quality: an indicator of sustainable management? *Applied Soil Ecology* **15**, 75–83.

BIBLIOGRAFÍA

- Hess, S., Wenger, A.S., Ainsworth, T.D., Rummer, J.L. (2015). Exposure of clownfish larvae to suspended sediment levels found on the Great Barrier Reef: impacts on gill structure and microbiome. *Scientific Reports* **5**, 1-8.
- Heuer, H., Smalla, K. (1997). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for studying soil microbial communities. *Modern Soil Microbiology* (van Elsas JD, Trevors JT & Wellington EMH, eds), pp. 353–373. Marcel Dekker, New York.
- Heuer, H., Krsek, M., Beker, P., Smalla, K., Wellington, E.M.H. (1997). Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied Environmental Microbiology* **63**, 3233–3241.
- Heuer, H., Krogerrecklenfort, E., Wellington, E.M.H. *et al.* (2002). Gentamicin resistance genes in environmental bacteria: prevalence and transfer. *FEMS Microbiology Ecology* **42**, 289–302.
- Heuer, H., Smalla, K. (2012). Plasmids foster diversification and adaptation of bacterial populations in soil. *FEMS Microbiology Reviews* **36**, 1083–1104.
- Heuer, H., Binh, C.T.T., Jechalke, S., Kopmann, C., Zimmerling, U., Krögerrecklenfort, E., Ledger, T., González, B., Top, E.M., Smalla, K. (2012). IncP-1 ϵ plasmids are important vectors of antibiotic resistance genes in agricultural systems: diversification driven by class 1 integron gene cassettes. *Frontiers in Microbiology* **3**, 1–8.
- Hiera da Cruz, L., de Santana, H., Zaia, C.T.B.V., Zaia, D.A.M. (2007). Adsorption of glyphosate on clays and soils from Parana state: Effect of pH and competitive adsorption of phosphate. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **50**, 385–394.
- Hirakawa, H., Schaefer, A.L., Greenberg, E.P., Harwood, C.S. (2012). Anaerobic *p*-coumarate degradation by *Rhodopseudomonas palustris* and identification of CouR, a MarR repressor protein that binds *p*-coumaroyl coenzyme. *American Journal of Bacteriology* **194**, 1960–1967.
- Hoagland, R.E. (1980). Effects of glyphosate on metabolism of phenolic compounds: VI. Effects of glyphosine and glyphosate metabolites on phenylalanine ammonia-lyase activity, growth, and protein, chlorophyll, and anthocyanin levels in soybean (*Glycine max*) seedlings. *Weed Science* **28**, 393–400.
- Højberg O., Sørensen J. (1993). Microgradients of microbial oxygen consumption in a barley rhizosphere model system. *Applied Environmental Microbiology* **59**, 431–437.
- Horwath, W.R., Paul, E.A. (1994). Microbial Biomass. En: Angle, S., Weaver, R., Bottomley, P., Bezdicsek, D., Smith, S., Tabatabai, A., Wollum, A. (Eds.). *Methods of Soil Analysis. Part 2. Microbiological and Biochemical Properties*. SSSA, Madison, WI, pp. 753–773.
- Hove-Jensen, B., Zechel, D.L., Jochimsena, B. (2014). Utilization of Glyphosate as Phosphate Source: Biochemistry and Genetics of Bacterial Carbon-Phosphorus Lyase. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **78(1)**, 176–197.
- Hugenholtz, P. (2002). Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biology* **3(2)**, reviews0003.1–reviews0003.8.
- Huntington, T.G. (2006) Evidence for intensification of the global water cycle: review and synthesis. *Journal of Hydrology* **319(1–4)**, 83–95.
- Hurlbert, S. (1984). Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. *Ecological Monographs* **54(2)**, 187–211.
- Husson, F., Josse, J., Lê S, Mazet, J. (2007). FactoMineR: Factor Analysis and Data Mining with R. R package version 1.04, URL <http://CRAN.R-project.org/package=FactoMineR>.
- Ilmarinen, K., Mikola, J., Vestberg, M. (2008). Do interactions with soil organisms mediate grass responses to defoliation? *Soil Biology and Biochemistry* **40**, 894–905.
- Imparato, V., Santos, S.S., Johansen, A., Geisenb, S., Winding, A. (2016). Stimulation of bacteria and protists in rhizosphere of glyphosate-treated barley. *Applied Soil Ecology* **98**, 47–55.
- Insam, H., Amor, K., Renner, M., Crepaz, C. (1996). Changes in functional abilities of the microbial community during composting of manures. *Microbial Ecology* **31**, 77–87.

BIBLIOGRAFÍA

- Insam, H. (1997). A new set of substrates proposed for community characterization in environmental samples. En: Insam, H., Rangger, A. (Eds.). *Microbial communities: functional versus structural approaches*. Springer, Berlin, pp 259–260.
- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Taller Aspectos ambientales del uso de glifosato. Balcarce, Noviembre de 2010.
- Iovieno, P., Bååth, E. (2008). Effect of drying and rewetting on bacterial growth rates in soil. *FEMS Microbiology Ecology* **65**, 400–440.
- Iwasaki, W., Takagi, T. (2009). Rapid pathway evolution facilitated by horizontal gene transfers across prokaryotic lineages. *PLoS Genetics* **5**, e1000402.
- Jacoby, G.A., Jacob, A.E., Hedges, R.W. (1976). Recombination between plasmids of incompatibility groups P-1 and P-2. *Journal of Bacteriology* **127**, 1278–1285.
- Jechalke, S., Dealtry, S., Smalla, K., Heuer, H. (2013). Quantification of IncP-1 plasmid prevalence in environmental samples. *Applied Environmental Microbiology* **79**, 1410–1413.
- Johal, G.S., Rahe, J.E. (1984). Effect of soilborne plant-pathogenic fungi on the herbicidal action of glyphosate on bean seedlings. *Phytopathology* **74**, 950–955.
- Junier, P., Molina, V., Dorador, C., Hadas, O., Kim, O-S., Junier, T., Witzel, K-P., Imhoff, J.F. (2010). Phylogenetic and functional marker genes to study ammonia-oxidizing microorganisms (AOM) in the environment. *Applied Microbiology and Biotechnology* **85**, 425–440.
- Justes, E., Mary, B., Nicolardot, B. (1999). Comparing the effectiveness of radish cover crop, oilseed rape volunteers and oilseed rape residues incorporation for reducing nitrate leaching. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **55**, 207–220.
- Karlovsky, P. (2008). Secondary Metabolites in Soil Ecology. En: Karlovsky P (ed.) *Secondary Metabolites in Soil Ecology*. Springer. Heidelberg. pp. 1–19.
- Karpouzas, D.G., Tsiamis, G., Trevisan, M., Ferrari, F., Malandain, C., Sibourg, O., Martin-Laurent, F. (2016). Love to Hate pesticides: felicity or curse for the soil microbial community? An FP7 IAPP Marie Curie project aiming to establish tools for the assessment of the mechanisms controlling the interactions of pesticides with soil microorganisms. *Environmental Science Pollution Resources* **23(18)**, 18947–18951.
- Kennedy, A.C., Smith, K.L. (1995). Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant and Soil* **170**, 75–86.
- Kishore, G.H., Jacob, G.S. (1987). Degradation of glyphosate by *Pseudomonas* sp. PG2982 via a sarcosine intermediate. *Journal of Biological Chemistry* **262**, 12164–12168.
- Klimek, M., Lejck, B., Kafarski, P., Forlani, G. (2001). Metabolism of the phosphonate herbicide glyphosate by a non-nitrate utilising strain of *Penicillium chrysogenum*. *Pest Management Science* **57**, 815–821.
- Klümper, U., Riber, L., Dechesne, A., Sannazzarro, A., Hansen, L.H., Sørensen, S.J., Smets, B.F. (2014). Broad host range plasmids can invade an unexpectedly diverse fraction of a soil bacterial community. *The ISME Journal* **9**, 934–945.
- Knezevic, S.Z., Streibig, J.C., Ritz, C. (2007). Utilizing R software package for dose–response studies: the concept and data analysis. *Weed Technology* **21(3)**, 840–848.
- Kononova, S.V., Nesmeyanova, M.A. (2002). Phosphonates and their degradation by microorganisms *Biochemistry (Moscow)* **67(2)**, 184–195.
- Kornecki, T.S., Price, A.J., Raper, R.L., Arriaga, F.J. (2009). New roller crimper concepts for mechanical termination of cover crops in conservation agriculture. *Renewable Agricultural Food Systems* **24**, 165–173.
- Kowalchuk, G.A., Stephen, J.R. (2001). Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annual Reviews of Microbiology* **55**, 485–529.
- Kowalchuk, G.B., Buma, D.S., De Boer, W., Klinkhamer, P., van Veen, J.A. (2002). Effects of aboveground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**, 509–520.

BIBLIOGRAFÍA

- Kremer, R.J., Means, N.E., Kim, S. (2005). Glyphosate affects soybean root exudation and rhizosphere micro-organisms. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **85**, 1165–1174.
- Krzysko-Lupicka, T., Orlik, A. (1997). The use of glyphosate as the sole source of phosphorus or carbon for the selection of soil-borne fungal strains capable to degrade this herbicide. *Chemosphere* **34**, 2601–2605.
- Krogh, K.A., Halling Sørensen, B., MØrgensen, B.B., Vejrup, K.V. (2003). Environmental properties and effects of non-ionic surfactant adjuvants in pesticides: a review. *Chemosphere* **50**, 871–901.
- Krol, J.E., Penrod, J.T., McCaslin, H., Rogers, L.M., Yano, H., *et al.* (2012) Role of IncP-1 beta plasmids pWDL7::rfp and pNB8c in chloroaniline catabolism as determined by genomic and functional analyses. *Applied and Environmental Microbiology* **78**, 828–838.
- Kropf, S., Heuer, H., Gruning, M., Smalla, K. (2004). Significance test for comparing complex microbial community fingerprints using pairwise similarity measures. *Journal of Microbiological Methods* **57**, 187–195.
- Kulshrestha, G., Singh, S.B., Lal, S.P., Yaduraju, N.T. (2000). Effect of long-term field application of pendimethalin: enhanced degradation in soil. *Pest Management Science* **56**, 202–206.
- Laitinen, P., Rämö, S., Siimes, K. (2007). Glyphosate translocation from plants to soil – does this constitute a significant proportion of residues in soil? *Plant and Soil* **300**, 51–60.
- Lancaster, S.H., Hollister, E.B., Senseman, S.A., Gentry, T.J. (2010). Effects of repeated glyphosate applications on soil microbial community composition and the mineralization of glyphosate. *Pest Management Science* **66**, 59–64.
- LeBlanc, J.C., Gonçalves, E.R., Mohn, W.W. (2008). Global response to desiccation stress in the soil actinomycete *Rhodococcus jostii* RHA1. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 2627–2636.
- Legleiter, T., Johnson, B., Jordan, T., Gibson, K. (2012). Successful Cover Crop Termination with Herbicides. Purdue Extension. Technical Report WS-50-W. Purdue University. Disponible online: <http://www.ag.purdue.edu/btny/weedscience>.
- Lehman, R.M., Garland, J.L., Osborne, S.L. (2013). Applying an oxygen-based respiratory assay to assess soil microbial responses to substrate and N availability. *Applied Soil Ecology* **64**, 127–134.
- Leininger, S., Urich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G.W., Prosser, J.I., Schuster, S.C., Schleper, C. (2006). *Archaea* predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* **442**, 806–809.
- Levesque, C.A., Rahe, J.E., Eaves, D.M. (1987). Effects of glyphosate on *Fusarium* spp. – Its influence on root colonization of weeds, propagule density in the soil, and crop emergence. *Canadian Journal of Microbiology* **33**, 354–360.
- Levinton, J., Suatoni, E., Wallace, W., Junkins, R., Kelaher, B., Allen, B.J. (2003). Rapid loss of genetically based resistance to metals after the cleanup of a Superfund site. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the U.S.A.* **100**, 9889–9891.
- Li, J-G., Shen, M-C., Hou, J-F., Li, L., Wu, J-X., Dong, Y-H. (2016). Effect of different levels of nitrogen on rhizosphere bacterial community structure in intensive monoculture of greenhouse lettuce. *Scientific Reports* **6**, 25305.
- Littell, R.C., Stroup, W.W., Freund, R.J. (2002). Analysis of Variance for Balanced Data. En: SAS Institute (Ed). SAS for Linear Models, Fourth Edition. Wiley Series in Probability and Statistics. ISBN: 978-0-471-22174-6, pp. 87–88.
- Liu, C.M., McLean, P.A., Sookdeo, C.C., Cannon, F.C. (1991). Degradation of the herbicide glyphosate by members of the family *Rhizobiaceae*. *Applied Environmental Microbiology* **57**, 1799–1804.
- Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H., Forney, L.J. (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology* **63**, 4516–4522.

BIBLIOGRAFÍA

- Liu, Z., Lozupone, C., Hamady, M., Bushman, F.D., Knight, R. (2007). Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Research* **35**, e120.
- Lu, M., Xu, K., Chen, J. (2013). Effect of pyrene and cadmium on microbial activity and community structure in soil. *Chemosphere* **91**, 491–497.
- Lu, Y.C., Watkins, K.B., Teasdale, J.R., Abdul-Baki, A.A. (2000). Cover crop in sustainable food production. *Food Reviews International* **16**, 121–157.
- Mäder, P., Fließbach, A., Dubois, D., Gunst, L., Fried, P., Niggli, U. (2002). Soil fertility and biodiversity in organic farming. *Science* **296**, 1694–1697.
- Mamy, L., Barriuso, E., Gabrielle, B. (2016). Glyphosate fate in soils when arriving in plant residues. *Chemosphere* **154**, 425–433.
- Marcos, M.S., Lozada, M., Di Marzio, W.D., Dionisi, H.M. (2012). Abundance, dynamics, and biogeographic distribution of seven polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase gene variants in coastal sediments of Patagonia. *Applied Environmental Microbiology* **78**, 1589–1592.
- Martinez, B., Tomkins, J., Wackett, R., Wing, R., Sadowsky, M.J. (2001). Complete nucleotide sequence and organization of the atrazine catabolic plasmid pADP-1 from *Pseudomonas* sp. strain ADP. *Journal of Bacteriology* **183**, 5684–5697.
- Mason, O. U., Hazen, T. C., Borglin, S., Chain, P. S., Dubinsky, E. A., Fortney, J. L., Han, J., Holman, H. Y., Hultman, J., Lamendella, R., Mackelprang, R., Malfatti, S., Tom, L. M., Tringe, S. G., Woyke, T., Zhou, J., Rubin, E. M., Jansson, J. K. (2012). Metagenome, metatranscriptome and single-cell sequencing reveal microbial response to Deepwater Horizon oil spill. *The ISME Journal* **6**, 1715–1727.
- McGrath, J.W., Ternan, N.G., Quinn, J.P. (1997). Utilization of organophosphonates by environmental microorganisms. *Letters in Applied Microbiology* **24**, 69–73.
- Mendes, R., Garbeva, P., Raaijmakers, J.M. (2013). The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews* **37**, 634–663.
- Mendum, T.A., Sockett, R.E., Hirsch, P.R. (1999). Use of molecular and isotopic techniques to monitor the response of autotrophic ammonia-oxidizing populations of the β subdivision of the class Proteobacteria in arable soils to nitrogen fertilizer. *Applied Environmental Microbiology* **65**, 4155–4162.
- Mertens, J., Springael, D., De Troyer, I., Cheyns, K., Wattiau, P., Smolders, E. (2006). Long-term exposure to elevated zinc concentrations induced structural changes and zinc tolerance of the nitrifying community in soil. *Environmental Microbiology* **8(12)**, 2170–2178.
- Mijangos, I., Becerril, J.M., Albizu, I., Epelde, L., Garbisu, C. (2009). Effects of glyphosate on rhizosphere soil microbial communities under two different plant compositions by cultivation-dependent and -independent methodologies. *Soil Biology and Biochemistry* **41**, 505–513.
- Millennium Ecosystem Assessment. (2005). Ecosystems and Human Well-being: Biodiversity Synthesis. World Resources Institute. URL: <http://www.maweb.org>. (Fecha de último acceso: Diciembre 2014).
- Mincer, T.J., Church, M.J., Taylor, L.T., Preston, C., Karl, D.M., DeLong, E.F. (2007). Quantitative distribution of presumptive archaeal and bacterial nitrifiers in Monterey Bay and the North Pacific Subtropical Gyre. *Environmental Microbiology* **9**, 1162–1175.
- Mølbak, L., Molin, S., Kroer, N. (2007). Root growth and exudate production define the frequency of horizontal plasmid transfer in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology* **59**, 167–176.
- Montecchia, M.S., Correa, O.S., Soria, M.A., Frey, S.D., García, A.F. y Garland, J.L. (2011). Multivariate approach to characterizing soil microbial communities in pristine and agricultural sites in Northwest Argentina. *Applied Soil Ecology* **47**, 173–186.
- Moorman, T. B.; Becerril, J. M.; Lydon, J.; Duke, S. O. (1992). Production of hydroxybenzoic acids by *Bradyrhizobium japonicum* strains after treatment with glyphosate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**, 289–293.

BIBLIOGRAFÍA

- Mukherjee, N., Dowd, S.E., Wise, A., Kedia, S., Vohra, V., Banerjee, P. (2014). Diversity of Bacterial Communities of Fitness Center Surfaces in a U.S. Metropolitan Area. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **11**(12), 12544–12561.
- Mullen, M., Melhorn, C., Tyler, D., Duck., B. (1998). Soil properties in no till corn with different cover crop. *Soil and Water conservation* **53**, 219–224.
- Muyzer, G., Waal, E.C.D., Uitterlinden A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction–amplified gene coding for 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology* **59**, 695–700.
- Nafziger, E.D.; Widholm, J.M.; Steinrcken, H.C.; Killmer, J.L. (1984). Selection and Characterization of a Carrot Cell Line Tolerant to Glyphosate. *Plant Physiology* **76**, 571–574.
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M. T., Landi, L., Pietramellara, G. Renella, G. (2003). Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science* **54**, 655–670.
- Nesme, J., Simonet, P. (2015). The soil resistome: a critical review on antibiotic resistance origins, ecology and dissemination potential in telluric bacteria. *Environmental Microbiology* **17**(4), 913–930.
- Neumann, G., Kohls, S., Landsberg, E., Stock-Oliveira Souza, K., Yamada, T., Römheld, V., (2006). Relevance of glyphosate transfer to non-target plants via the rhizosphere. *Journal of Plant Disease and Protection* **20** (Special issue), 963–969.
- Newman, M.M., Hoilett, N., Lorenz, N., Dick, R.P., Liles, M.R., Ramsier, C., Kloepper, J.W. (2016a). Glyphosate effects on soil rhizosphere–associated bacterial communities. *Science of the Total Environment* **543**, 155–160.
- Newman, M.M., Lorenz, N., Hoilett, N., Lee, N.R., Dick, R.P., Liles, M.R., Ramsier, C., Kloepper, J.W. (2016b). Changes in rhizosphere bacterial gene expression following glyphosate treatment. *Science of the Total Environment* **553**, 32–41.
- Nicolaisen, M.H., Ramsing, N.B. (2002). Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia–oxidizing bacteria. *Journal of Microbiological Methods* **50**(2), 189–203.
- Nielsen, M.N., Winding, A. (2002). Microorganisms as indicators of soil health. Technical Report n° 388. National Environmental Research Institute, Denmark. Disponible online. URL: http://www.dmu.dk/1_viden/2_Publikationer/3_fagrappporter/rapporter/FR388.pdf
- Nguyen Binh, D., Rose, M.T., Rose, T.J., Morris, S.G., van Zwieten, L. (2016). Impact of glyphosate on soil microbial biomass and respiration: A meta–analysis. *Soil Biology and Biochemistry* **92**, 50–57.
- Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wiesenhuber, A., Amann, RI, Ludwig, W., Backhaus, H. (1996). Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology* **178**, 5636–5643.
- Nweke, C.O., Ahumibe, N.C., Orji, J.C. (2014). Toxicity of binary mixtures of formulated glyphosate and phenols to Rhizobium species dehydrogenase activity. *Journal of Microbiology Research* **4**(4), 161–169.
- Nye, M., Hoilett, N., Ramsier, C., Renz, P., Dick, R.P. (2014). Microbial community structure in soils amended with glyphosate–tolerant soybean residue. *Applied Ecology and Environmental Sciences* **2**, 74–81.
- Okada, E., Costa J.L., Bedmar, F. (2016). Adsorption and mobility of glyphosate in different soils under no-till and conventional tillage. *Geoderma* **263**, 78–85.
- Okano, Y., Hristova, K.R., Leutenegger, C.M., Jackson, L.E., Denison, R.F., Gebreyesus, B., Lebauer, D., Scow, K.M. (2004). Application of real–time PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia–oxidizing bacteria in soil. *Applied Environmental Microbiology* **70**, 1008–1016.
- Oksanen, J. (2015). Multivariate analysis of ecological communities in R: vegan tutorial. Disponible online. URL: <http://cc.oulu.fi/%7Ejarioksa/opetus/metodi/vegantutor.pdf>
- Oksanen, J. (2017). Vegan: ecological diversity. Disponible online. URL: <http://cran.irsu.fr/web/packages/vegan/vignettes/diversity-vegan.pdf>

BIBLIOGRAFÍA

- Ouyang, Y., Norton, J.M., Stark, J.M., Reeve, J.R., Habteselassie, M.Y. (2016). Ammonia-oxidizing bacteria are more responsive than archaea to nitrogen source in an agricultural soil. *Soil Biology and Biochemistry* **96**, 4–15.
- Paine, R.T., Tegner, M.J., Johnson, E.A. (1998). Compounded perturbations yield ecological surprises. *Ecosystems* **1**, 535–545.
- Papa, J.C., Tiesca, D., Ponsa, J.C., Picapietra, G. (2012). Confirmación de la resistencia a glifosato en un biotipo de raigrás anual (*Lolium multiflorum* Lam.) del noreste de la provincia de Buenos Aires. Trabajo presentado en las XIV Jornadas Fitosanitarias Argentinas. URL: <https://www.aapresid.org.ar/rem/wp-content/uploads/sites/3/2013/04/Papa-JC.-et-al.-Raigras-resistente-a-glifosato.pdf>
- Parks, D.H., Beiko, R.G. (2010). Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities. *Bioinformatics* **26**, 715–721.
- Parks, D.H. (2014). STAMP User's Guide v2. Disponible online: http://kiwi.cs.dal.ca/Software/images/0/02/STAMP_Users_Guide_v2.0.0.pdf. Acceso: Abril 2016.
- Parks, D.H., Tyson, G.W., Hugenholtz, P., Beiko, R.G. (2014). STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics*, **30** (21), 3123–3124.
- Peet, R. (1974). The measurement of species diversity. *Annual Review of Ecology, Evolutions and systematic* **5**, 285–307.
- Peng, X., Misawa, N., Harayama, S. (2003). Isolation and characterization of thermophilic bacilli degrading cinnamic, 4-coumaric, and ferulic acids. *Applied Environmental Microbiology* **69**, 1417–1427.
- Pereira, J.C., Neves, M.C.P., Drozdowicz, A. (1999). Influence of antibiosis produced by actinomycetes on strains of *Bradyrhizobium* spp. on soybean nodulation. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **34**(1), 99–108.
- Pereira, de Sá E., Galantini, J., Quiroga, A. (2012). Sistemas de cultivos de cobertura de suelo de otoño invierno: sus efectos sobre la disponibilidad de agua. En: C. Alvarez; A. Quiroga; S. Diego & M. Bodrero (Eds). Contribución de los cultivos de cobertura a la sustentabilidad de los sistemas de producción. Primera Ed. Pp. 76–81. La Pampa, Ediciones INTA.
- Pérez, G.L., Vera, M.S., Miranda, L. (2011). Effects of Herbicide Glyphosate and Glyphosate-Based Formulations on Aquatic Ecosystems, Herbicides and Environment, Dr. Andreas Kortekamp (Ed.), ISBN: 978-953-307-476-4, InTech, Disponible online en: <http://www.intechopen.com/books/herbicides-andenvironment/effects-of-herbicide-glyphosate-and-glyphosate-based-formulations-on-aquatic-ecosystems>.
- Pfeiffer, S., Pastar, M., Mitter, B., Lippert, K., Hackl, E., Lojan, P., Oswald, A., Sessitsch, A. (2014). Improved group-specific primers based on the full SILVA 16S rRNA gene reference database. *Environmental Microbiology* **16**(8), 2389–2407.
- Philippot, L., Raaijmakers, J.M., Lemanceau, P., Van der Putten, W.H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews* **11**, 789–799.
- Pimm, S.L. (1984). The complexity and stability of ecosystems. *Nature* **307**, 321–326.
- Pipke, R., Amrhein, N., Jacob, G.S., Schaefer, J., Kishore, G.M. (1987). Metabolism of glyphosate in an *Arthrobacter* sp. GLP-1. *European Journal of Biochemistry* **165**, 267–273.
- Pimentel, D. (1995) Amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics. *Journal of Agricultural and environmental Ethics* **8**, 17–29.
- Prosser, J.I., Nicol, G.W. (2012). Archaeal and bacterial ammonia-oxidisers in soil: the quest for niche specialisation and differentiation. *Trends in Microbiology* **20**, 523–531.
- Puglisi, E., Vasileiadis, S., Demiris, K., Bassi, D., Karpouzas, D., Capri, E., Cocconcelli, P. S., Trevisan, M. (2012). Impact of fungicides on the diversity and function of non-target ammonia-oxidizing microorganisms residing in a litter soil cover. *Microbial Ecology* **64**(3), 692–701.
- Qaim, M., Traxler, G. (2005). Roundup Ready soybeans in Argentina: farm level and aggregate welfare effects. *Agricultural Economics* **32**, 73–86.

BIBLIOGRAFÍA

- Qiu, H., Geng, J., Ren, H., Xia, X., Wang, X., Yu, Y. (2013). Physiological and biochemical responses of *Microcystis aeruginosa* to glyphosate and its Roundup® formulation. *Journal of Hazardous Materials* **248–249**, 172–176.
- Quinn, J.P., Peden, J.M.M., Dick, R.E. (1988). Glyphosate tolerance and utilization by the microflora of soils treated with the herbicide. *Applied Microbiology and Biotechnology* **29**, 511–516.
- Quinn, J.P., Peden, J.M.M., Dick, R.E. (1989). Carbon–phosphorus bond cleavage by Gram–positive and Gram–negative soil bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* **31**, 283–287.
- R Development Core Team. (2013). R: a Language and Environment for Statistical Computing. The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 3–900051–07–0. <http://www.R-project.org/>.
- R Development Core Team. (2015). R: a Language and Environment for Statistical Computing. The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 3–900051–07–0. <http://www.R-project.org/>.
- R Development Core Team (2016). R: a Language and Environment for Statistical Computing. The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 3–900051–07–0. <http://www.R-project.org/>.
- Rainero, H. P. (2008). Avances en el control de malezas con tolerancia a glifosato. Boletín de malezas. Informe Técnico, INTA Manfredi. Disponible online: http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/pasturas_combate_d_e_plagas_y_malezas/62-avances_conrol_tolerancia-glifosato.pdf. Acceso: Marzo 2016.
- Ramette, A. (2007). Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* **62**, 142–160.
- Rascovan, N., Carbonetto, B., Perrig, D., Díaz, M., Canciani, W., Abalo, M., Alloati, J., González-Anta, G., Vazquez, M.P. (2014). Integrated analysis of root microbiomes of soybean and wheat from agricultural fields. *Scientific Reports* **6**, 28084.
- Ratcliff, A.W., Busse, M.D., Shestak, C.J. (2006). Changes in microbial community structure following herbicide (glyphosate) additions to forest soils. *Applied Soil Ecology* **34**, 114–124.
- Raymann, K., Moeller, A.H., Goodman, A.L., Ochman, H. (2017). Unexplored archaeal diversity in the Great Ape Gut Microbiome. *mSphere* **2**, e00026–17.
- Richards, T.A., Dacks, J.B., Campbell, S.A., Blanchard, J. L., Foster, P. G., McLeod R., *et al.* (2006). Evolutionary origins of the eukaryotic shikimate pathway: gene fusions, horizontal gene transfer, and endosymbiotic replacements. *Eukaryotic Cell* **5**, 1517–1531.
- Ricordi, A., Tornisiello, V., Almeida, G. (2007). Translocação de ¹⁴C–glifosato entre *Brachiaria brizantha* e mudas de café (*Coffea arabia*) e citros (*Citrus limonia* Osbeck). En: Anais do simpósio internacional sobre glyphosate. Botucatu, Brazil FCA–UNESP, 307–310.
- Ritz, C., Streibig, J.C. (2012). Dose response curves and other nonlinear curves in weed science and ecotoxicology with the add-on package drc in R. URL: <http://www.bioassay.dk/index-filer/start/DraftDrcManual.pdf> (Fecha de ultimo acceso: Agosto 2014).
- Ritz, C., Streibig, J.C. (2013). Package “drc”: Analysis of dose–response curve data. Disponible online: URL <http://www.r-project.org>, <http://www.bioassay.dk>
- Roberts, C.W., Roberts, F., Lyons, R.E., Kirisits, M.J., Mui, E.J., Finnerty, J., Johnson, J.J., Ferguson, D.J., Coggins, J.R., Krell, T., Coombs, G.H., Milhous, W.K., Kyle, D.E., Tzipori, S., Barnwell, J., Dame, J.B., Carlton, J., McLeod, R. (2002). The shikimate pathway and its branches in apicomplexan parasites. *The Journal of Infectious Diseases* **185** (Supplement 1), S25–S36.
- Rodrigues, J.J.V., Worsham, A.D., Corbin, F.T. (1982). Exudation of glyphosate from wheat (*Triticum aestivum*) plants and its effects on interplanted corn (*Zea mays*) and soybeans (*Glycine max*). *Weed Science* **30**, 316–320.
- Roesch, L.F.W., Fulthorpe, R.R., Riva, A., *et al.* (2007). Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *The ISME Journal* **1**, 283–290.

BIBLIOGRAFÍA

- Romero, M., Reinoso, E., Kiernan, A. M., Córdoba, S. (2004). Biodegradation of glyphosate by wild yeasts. *Revista Mexicana de Micología* **19**, 45–50.
- Rotthauwe, J.H., Witzel, K.P., Liesack, W. (1997). The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied Environmental Microbiology* **63**(12), 4704–4712.
- Rousidou, C., Papadopoulou, E.S., Kortsinidou, M., Giannakou, I.O., Singh, B.K., Menkissoglu-Spiroudi, U., Karpouzas, D.G., 2013. Bio-pesticides: Harmful or harmless to ammonia oxidizing microorganisms? The case of a *Paecilomyces lilacinus*-based nematicide. *Soil Biology and Biochemistry* **67**, 98–105.
- Rueppel, M.L., Brightwell, B.B., Schaefer, J., Marvel, I.T. (1977). Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **25**(3), 517–528.
- Sáenz, C., Colazo, J. Costo hídrico de cultivos de cobertura invernales en San Luis. Primeras experiencias. En: C. Alvarez; A. Quiroga; S. Diego & M. Bodrero (Eds). Contribución de los cultivos de cobertura a la sustentabilidad de los sistemas de producción. Primera Ed. Pp. 16 – 20. La Pampa, Ediciones INTA.
- Samanta, S.K., Chakraborti, A.K., Jain, R.K. (1999). Degradation of phenanthrene by different bacteria: evidence for novel transformation sequences involving the formation of 1-naphthol. *Applied and Environmental Microbiology* **53**, 98–107.
- Sambrook, J., Russell, D. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Schafer, H., Muyzer, G. (2001). Denaturing gradient gel electrophoresis in marine microbial ecology. *Methods in Microbiology* **30**, 425–468.
- Schauss, K., Focks, A., Leininger, S., Kotzerke, A., Heuer, H., Thiele-Bruhn, S., Sharma, S., Wilke, B.M., Matthies, M., Smalla, K., Munch, J.C., Amelung, W., Kaupenjohann, M., Schloter, M., Schleper, C. (2009). Dynamics and functional relevance of ammonia-oxidizing archaea in two agricultural soils. *Environmental Microbiology* **11**, 446–456.
- Schoonover, J., Crim, J.F. (2015). An Introduction to Soil Concepts and the Role of Soils in Watershed Management. *Journal of Contemporary Water Research & Education* **154**(1), 21–47.
- Siciliano, S.D., Roy, R. (1999). The role of soil microbial tests in ecological risk assessment: differentiating between exposure and effects. *Human and Ecological Risk Assessment* **5**, 671–682.
- Schmidt, T., Schaechter, M. (2011). The rhizosphere. En: Topics in Ecological and Environmental Microbiology. Schmidt, T., Schaechter, M. (Eds). Academic Press, Oxford, UK, pp. 469–470.
- Schmitt, H., van Beelen, P., Tolls, J., Van Leeuwen, C.L. (2004). Pollution-induced community tolerance of soil microbial communities caused by the antibiotic sulfachloropyridazine. *Environmental Science and Technology* **38**, 1148–1153.
- Schulz, A., Kruper, A., Amrhein, N. (1985). Differential sensitivity of bacterial 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphatesynthases to the herbicide glyphosate. *FEMS Microbiology Letters* **28**, 297–301.
- Schumacher, W.J., Thill, D.C., Lee, G.A. (1983). Allelopathic potential of wild oat (*Avena fatua*) on spring wheat (*Triticum aestivum*) growth. *Journal of Chemical Ecology* **9**, 1235–1245.
- Seghers, D., Bulcke, R., Reheul, D., Siciliano, S., Top, E., Verstraete, W. (2003). Pollution induced community tolerance (PICT) and analysis of 16S rRNA genes to evaluate the long-term effects of herbicides on methanotrophic communities in soil. *European Journal of Soil Sciences* **54**, 679–684.
- Sen, D., Van der Auwera, G. A., Rogers, L. M., Thomas, C. M., Brown, C. J., and Top, E. M. (2011). Broad-host-range plasmids from agricultural soils have IncP-1 backbones with diverse accessory genes. *Applied and Environmental Microbiology* **77**, 7975–7983.
- Shade, A., Peter, H., Allison, S.D., Baho, D.L, Berga, M., et al. (2012). Fundamentals of microbial community resistance and resilience. *Frontiers in Microbiology* **3**, 417.

BIBLIOGRAFÍA

- Sharma, S., Radl, V., Hai, B., Kloos, K., Fuka, M., Engel, M. *et al.* (2007). Quantification of functional genes from procaryotes in soil by PCR. *Journal of Microbiological Methods* **68**, 445–452.
- Sharma, P., Goel, R., Capalash, N. (2007). Bacterial laccases. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **23**, 823–832.
- Shi, S., Nuccio, E., Herman, D.J., Rijkers, R., Estera, K., Li, J., da Rocha, U.N., He, Z., Pett-Ridge, J., Brodie, E.L., Zhou, J., Firestone, M. (2015). Successional trajectories of rhizosphere bacterial communities over consecutive seasons. *mBio* **6**(4), e00746-15.
- Singh, B. K., Walker, A. (2006). Microbial degradation of organophosphorous compounds. *FEMS Microbiological Reviews* **30**, 428–471.
- Singh, P., Mishra, L.C., Pandey, A., Iyengar, L. (2006). Degradation of 4-aminobenzenesulfonate by alginate encapsulated cells of *Agrobacterium* sp. PNS-1. *Bioresource Technology* **97**, 1655–1659.
- Sihtmäe, M., Blinova, I., Künnis-Beres, K., Kanarbik, L., Heinlaan, M., Kahru, A. (2013). Ecotoxicological effects of different glyphosate formulations. *Applied Soil Ecology* **72**, 215–224.
- Simonsen, L., Fomsgaard, I. S., Svensmark, B., Spliid, N. H. (2008). Fate and availability of glyphosate and AMPA in agricultural soil. *Journal of Environmental Science and Health Part B* **43**, 365–375.
- Smalla, K., Wachtendorf, U., Heuer, H., Liu, W.-T., Forney, L. (1998). Analysis of BIOLOG GN substrate utilization patterns by microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 1220–1225.
- Smalla, K., Wieland, G., Buchner, A., Zock, A., Parzy, J., Kaiser, S., Roskot, N., Heuer, H., Berg, G. (2001). Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Applied Environmental Microbiology* **67**, 4742–4751.
- Smalla, K., Heuer, H., Götz, A., Niemeyer, D., Krögerrecklenfort, E., Tietze, E. (2000). Exogenous isolation of antibiotic resistance plasmids from piggery manure slurries reveals a high prevalence and diversity of IncQ-like plasmids. *Applied Environmental microbiology* **66**, 4854–4862.
- Smalla, K., Haines, A.S., Jones, K., Krogerrecklenfort, E., Heuer, H., Schlöter, M., Thomas, C.M. (2006). Increased abundance of IncP-1 β plasmids and mercury resistance genes in mercury polluted river sediments: first discovery of IncP-1 β plasmids with a complex *mer* transposon as the sole accessory element. *Applied Environmental Microbiology* **72**, 7253–7259.
- Smith, P.E., Orvos, D.R., Cairns, J. (1993). Impact assessment using the before–after–control impact (BACI) model: concerns and comments. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **50**, 627–637.
- Snapp, S.S., Borden, H. (2005). Enhanced nitrogen mineralization in mowed or glyphosate treated cover crops compared to direct incorporation. *Plant and Soil* **270**, 101–112.
- Soderberg, K.H., Probanza, A., Jumpponen, A., Baath, E. (2004). The microbial community in the rhizosphere determined by community-level physiological profile (CLPP) and direct soil- and cfu PLFA techniques. *Applied Soil Ecology* **25**, 135–145.
- Soil Survey Staff. (2014). Natural Resources Conservation Service. U.S. Department of Agriculture. Web Soil Survey. Disponible online en: <http://websoilsurvey.nrcs.usda.gov>. Acceso: Marzo 2016.
- Song, W.Y., Kim, H.M., Hwang, C.Y., Schaad, N.W. (2004). Detection of *Acidovorax avenae* ssp. *avenae* in rice seeds using BIO-PCR. *Journal of Phytopathology* **152**, 667–676.
- Sprinkle, P., Meggitt, W.F., Penner, D. (1975). Rapid inactivation of glyphosate in the soil. *Weed Science* **23**, 224–228.
- SSSA. (2008). Glossary of Soil Science Terms. Soil Science Society of America. Madison, WI.
- Subbarao, G.V., Sahrawat, K.L., Nakahara, K., Rao, I.M., Ishitani, M., Hash, C.T., Kishii, M., Bonnett, D.G., Berry, W.L., Lata, J.C. (2013). A paradigm shift towards low-nitrifying

- production systems: the role of biological nitrification inhibition (BNI). *Annals of Botany* **112**, 297–316.
- Subbarao, G.V., Yoshihashi, T., Worthington, M., Nakahara, K., Ando, Y., Sahrawat, K.L., Rao, I.M., Lata, J.C., Kishii, M., Braun, H.J. (2015). Suppression of soil nitrification by plants. *Plant Science* **233**, 155–164.
- Suneetha, V., Zaved, A.K. (2011). Actinomycetes: Sources for Soil Enzymes. En: Shukla, G., Varma, A. (Eds) *Soil Enzymology*. Springer. Heidelberg. Pp. 259–269.
- Sutherland, J.B., Crawford, D.L., Pometto III, A.L. (1983). Metabolism of cinnamic, *p*-coumaric, and ferulic acids by *Streptomyces setonii*. *Canadian Journal of Microbiology* **29**, 1253–1257.
- Suzuki, M.T., Taylor, L.T., DeLong, E.F. (2000). Quantitative analysis of small subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5' nuclease assays. *Applied Environmental Microbiology* **66**, 4605–4614.
- Sviridov, A.V., Shushkova, T.V., Zelenkova, N.F., Vinokurova, N.G., Morgunov, I.G., Ermakova, I.T., Leontievsky, A.A. (2012). Microbial Degradation of Glyphosate Herbicides (Review). *Applied Microbiology and Biotechnology* **93**, 787–796.
- Swanson, K. S., S. E. Dowd, *et al.* (2011). Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice. *The ISME Journal* **5(4)**, 639–649.
- Swift, M.J., Heal, O.W., Anderson, J.M. (1979). Decomposition in terrestrial ecosystems. Swift, M.J., Heal, O.W., Anderson, J.M. (Eds). University of California Press, Berkeley, pp. 372.
- Tavares, L.T.C., Normando, L.R.O., Vasconcelos, A.T.R., Gerber, A.L., Agnez-Lima, L.F., Melo, V.M.M. (2016). Metagenomic analysis of sediments under seaports influence in the Equatorial Atlantic Ocean. *Science of the Total Environment* **557–558**, 888–900.
- Teasdale, J.R. (1996). Contribution of cover crops to weed management in sustainable agricultural systems. *Journal of Production Agriculture* **9**, 475–479.
- Tesfamariam, T., Bott, S., Neumann, G., Cakmak, I., Römheld, V. (2009). Glyphosate in the rhizosphere–role of waiting time and different glyphosate binding forms in soils for phytotoxicity to non–target plants. *European Journal of Agronomy* **31**, 126–132.
- Thion, C.E., Poirel, J.D., Cornulier, T., De Vries, F.T., Bardgett, R.D., Prosser, J.I. (2016). Plant nitrogen–use strategy as a driver of rhizosphere archaeal and bacterial ammonia oxidiser abundance. *FEMS Microbiology Ecology* **92(7)**, pii: fiw091.
- Tilman, D., Cassman, K.G., Matson, P.A., Naylor, R., Polasky, S. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* **418(6898)**, 671–677.
- Top, E.M., Holben, W.E., Forney, L.J. (1995) Characterization of diverse 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degradative plasmids isolated from soil by complementation. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 1691–1698.
- Torsvik, V., Goksoyr, J., Daae, F.L. (1990). High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 782–787.
- Torsvik, V., Ovreas, L., Thingstad, T.F. (2002) Prokaryotic diversity – magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science* **296**, 1064–1066.
- Trefault, N., De la Iglesia, R., Molina, A.M., Manzano, M., Ledger, T., Pérez-Pantoja, D., Sánchez, M.A., Stuardo, M., González, B. (2004). Genetic organization of the catabolic plasmid pJP4 from *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) reveals mechanisms of adaptation to chloroaromatic pollutants and evolution of specialized chloroaromatic degradation pathways. *Environmental Microbiology* **6**, 655–668.
- Trigo, E. (2011). Fifteen years of genetically modified crops in Argentine agriculture. Disponible online:
http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/15_YEARS_OF_GM_CROPS_IN_Argentine_AGRICULTURE.pdf. Acceso: Marzo 2016.
- Turner, T.R., Ramakrishnan, K., Walshaw, J., Heavens, D., Alston, M., Swarbreck, D., Osbourn, A., Grant, A., Poole, P.S. (2013). Comparative metatranscriptomics reveals kingdom level changes in the rhizosphere microbiome of plants. *The ISME Journal* **7**, 2248–2258.

BIBLIOGRAFÍA

- Turtura, G.S., Massa, S., Casalicchio, G. (1989). Levels of some free organic acids in soils and effects of their addition on nitrification. *Zentralblatt für Mikrobiologie* **144**, 173-179.
- Tush, D., Meyer, M.T. 2016. Polyoxyethylene Tallow Amine, a Glyphosate Formulation Adjuvant: Soil Adsorption Characteristics, Degradation Profile, and Occurrence on Selected Soils from Agricultural Fields in Iowa, Illinois, Indiana, Kansas, Mississippi, and Missouri. *Environmental Science and Technology* **50**, 5781– 5789.
- van Bruggen, A.H.C, Semenov, A.M., van Diepeningen, A.D., de Vos O.J., Blok, W.J. (2006). Relation between soil health, wave-like fluctuations in microbial populations, and soil-borne plant disease management. *European Journal of Plant Pathology* **115**, 105-122.
- Van der Heijden, M.G.A., Bardgett, R.D., Van Straalen, N.M. (2008). The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* **11**, 296-310.
- van Elsas, J.D., Turner, S., Bailey, M.J. (2003) Horizontal gene transfer in the phytosphere. *New Phytologist* **157**, 525-537.
- van Elsas, J.D., Chiurazzi, M., Mallon, C.A., Krištufek, E.V., Salles, J.F. (2012). Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the U.S.A.* **109**, 1159-1164.
- Vandenkoornhuyse, P., Mahe, S., Ineson, P., Staddon, P. (2007). Active root-inhabiting microbes identified by rapid incorporation of plant-derived carbon into RNA. *Proceedings of the National Academic Sciences of the U.S.A.* **104**, 16970-16975.
- Varela, M.F., Fernández, P.L., Rubio, G., Taboada, M.A. (2011). Cultivos de cobertura: efectos sobre la macroporosidad y la estabilidad estructural de un suelo franco-limoso. *Ciencia del Suelo* **29**, 99-106.
- Vedler, E., Vahter, M., Heinaru, A. (2004). The completely sequenced plasmid pEST4011 contains a novel IncP1 backbone and a catabolic transposon harboring *tfd* genes for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation. *Journal of Bacteriology* **186**, 7161-7174.
- Velvis, H. (1997). Evaluation of the selective respiratory inhibition method for measuring the ratio of fungal:bacterial activity in acid agricultural soils. *Biology and Fertility of Soils* **25**, 354-360.
- Vereecken, H. (2005). Mobility and leaching of glyphosate: a review. *Pest Management Science* **61**, 1139-1151.
- VIB. (2013). Fact Series: Herbicide Resistant Soybean in Argentina. Disponible online: <http://www.vib.be/en/about-vib/plant-biotech-news/Documents>. Acceso: Marzo 2017.
- Vigna, M., López, R.L. (2002). Control residual de malezas en presembrado de trigo en siembra directa. Informe técnico, INTA Bordenave.
- Vigna, M., López, R., Gigón, R. (2008). Efecto de Glifosato sobre Cultivares de Raigrás en el SO de Buenos Aires. XXVI° Congresso Brasileiro de Plantas Daninhas. XVIII Congresso de la Asociación Latinoamericana de Malezas. 4 a 8 de Mayo de 2008. Ouro Preto: MG: Brasil.
- Villamil, M.B.; Bollero, G.A.; Darmody, R.G.; Simmons, F.W., Bullock, D.G. (2006). No-Till Corn/Soybean Systems Including Winter Cover Crops: Effects on Soil Properties. *Soil Science Society of America Journal* **70**, 1936-1944.
- Waldrop, M.P., Balser, T.C., Firestone, M.K. (2000). Linking microbial community composition to function in a tropical soil. *Soil Biology and Biochemistry* **26**, 1837-1846.
- Wang, J., Liu, Q., Zhang, J., Cai, Z. (2015). Conversion of forest to agricultural land affects the relative contribution of bacteria and fungi to nitrification in humid subtropical soils. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B – Soil and Plant Science* **65(1)**, 83-88.
- Ward, B.B. (2013). Nitrification. En: Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences. Elsevier. Update of Encyclopedia of Ecology (2008), pp. 2511-2518. Disponible online: https://www.princeton.edu/nitrogen/publications/pdfs/Ward_2015_Nitrification.pdf
- Wardle, D.A., Ghani, A. (1995). A critique of the microbial metabolic quotient (qCO₂) as a bioindicator of disturbance and ecosystem development. *Soil Biology and Biochemistry* **27**, 1601-1610.

- Wardle, D.A., Parkinson, D. (1990). Effects of three herbicides on soil microbial biomass and activity. *Plant and Soil* **122**, 21–28.
- Watson, S.K., Carter P.E. (2008). Environmental influences on *Acinetobacter* sp. strain BD413 transformation in soil. *Biology and Fertility of Soils* **45**, 83–92.
- Weaver, M.A., Krutz, L.J., Zablotowicz, R.M., Reddy, K.N. (2007). Effects of glyphosate on soil microbial communities and its mineralization in a Mississippi soil. *Pest Management Science* **63**, 388–393.
- Wertz, S., Degrange, V., Prosser, J.I., Poly, F., Commeaux, C., Guillaumaud, N., Le Roux, X. (2007). Decline of soil microbial diversity does not influence the resistance and resilience of key soil microbial functional groups following a model disturbance. *Environmental Microbiology* **9**, 2211–2219.
- Wessen, E., Hallin, S. (2011). Abundance of archaeal and bacterial ammonia-oxidizers: possible bioindicator for soil monitoring. *Ecological Indicators* **11**, 1696–1698.
- White, J.R., Nagarajan, N., Pop, M. (2009). Statistical methods for detecting differentially abundant features in clinical metagenomic samples. *PLoS Computational Biology* **5**, e1000352.
- Wilson, J.B. (1988). The cost of heavy-metal tolerance: An example. *Evolution* **42**, 408–413.
- Winding, A., Hendriksen, N.B. (2007). Comparison of CLPP and enzyme activity assay for functional characterization of bacterial soil communities. *Journal of Soils and Sediments* **7**(6), 411–417.
- Wodnicka, M., Guarino, R.D., Hemperly, J.J., Thomas, M.R., Stitt, D., Pitner, J.B. (2000). Novel fluorescent technology platform for high throughput cytotoxicity and proliferation assays. *Journal of Biomolecular Screening* **5**, 141–152.
- Wright, D.G. (2010). Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Current Opinion in Microbiology* **13**, 589–594.
- Wu, F., Wang, X., Xue, C. (2009). Effect of cinnamic acid on soil microbial characteristics in the cucumber rhizosphere. *European Journal of Soil Biology* **45**, 356–362.
- Xue, C., Zhang, X., Zhu, C., et al. (2016). Quantitative and compositional responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria to long-term field fertilization. *Scientific Reports* **6**, 28981.
- Yanai, R.D., Majdi, H., Park BB. (2003). Measured and modeled differences in nutrient concentrations between rhizosphere and bulk soil in a Norway spruce stand. *Plant and Soil* **257**, 133–142.
- Yang, R.X., Gao, Z.G., Liu, X., Yao, Y., Cheng, Y., Huang, J., McDermott, M.I. (2015). Effects of phenolic compounds of muskmelon root exudates on growth and pathogenic gene expression of *Fusarium oxysporum* f. sp. melonis. *Allelopathy Journal* **35**(2): 175–186.
- Yao, X., Min, H., Lü, Z., Yuan, H. (2006). Influence of acetamiprid on soil enzymatic activities and respiration. *European Journal Soil Biology* **42**, 120–126.
- Zabaloy, M.C., Lehman, M., Frey, S.D., Garland, J.L. (2008a). Optimization of an oxygen-based approach for community-level physiological profiling of soils. *Soil Biology and Biochemistry* **40**, 2960–2969.
- Zabaloy, M.C., Garland, J.L., Gómez, M.A. (2008b). An integrated approach to evaluate the impacts of the herbicides glyphosate, 2,4-D and metsulfuron-methyl on soil microbial communities in the Pampas region, Argentina. *Applied Soil Ecology* **40**, 1–12.
- Zabaloy, M.C., Gómez, M.A. (2008). Microbial respiration in soils of the Argentine pampas after metsulfuron methyl, 2,4-D and glyphosate treatments. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **39**, 370–385.
- Zabaloy, M.C., Garland, J.L., Gómez, M.A. (2010). Assessment of the impact of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on indigenous herbicide-degrading bacteria and microbial community function in an agricultural soil. *Applied Soil Ecology* **46**, 240–246.
- Zabaloy, M.C., Zanini, G.P., Vianchinotti, V., Garland, J.L., Gómez, M.A. (2011). Herbicides in the Soil Environment: Linkage between Bioavailability and Microbial Ecology. En: Soloneski,

BIBLIOGRAFÍA

- S., Larramendy, M.L. (Eds.), *Herbicides, Theory and Applications*. INTECH, Rijeka, Croacia. ISBN: 978-953-307-975-2, pp. 161–192 (Cap. 9).
- Zabaloy, M.C., Gómez, E., Garland, J.L., Birmele, M., Gómez, M.A. (2012). Assessment of microbial community function and structure in soil microcosms exposed to glyphosate. *Applied Soil Ecology* **61**, 333–339.
- Zabaloy, M.C., Carne, I., Viassolo, R., Gómez, M., Gómez, E. (2016a). Soil ecotoxicity assessment of glyphosate use under field conditions: microbial activity and community structure of Eubacteria and ammonia-oxidizing bacteria. *Pest Management Science* **72(4)**, 684–691.
- Zabaloy, M.C., Garland, J.L., Allegrini, M., Gómez, E. (2016b). Soil microbial community-level physiological profiling as related to carbon and nitrogen availability under different land uses. *Pedosphere* **26(2)**, 216–225.
- Zabaloy, M.C., Allegrini, M., Tebbe, D.A., Schuster, K., Gómez, E. (2017). Nitrifying bacteria and archaea withstanding glyphosate in fertilized soil microcosms. *Applied Soil Ecology* **117–118**, 88–95.
- Zablotowicz, R.M., Reddy, K.N. (2004). Impact of glyphosate on the *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis with glyphosate-resistant transgenic soybean: a mini review. *Journal of Environmental Quality* **33**, 825–831.
- Zablotowicz, R.A., Krutz, L.J., Reddy, K.N., Weaver, M.A., Koger, C.G., Locke, M.A. (2007). Rapid development of enhanced atrazine degradation in a Dundee silt loam under continuous corn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 852–859.
- Zeng, J., Lin, X., Zhang, J., Xuanzhen, L., Wong, M.H. (2011). Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the bacterial laccase CueO from *E. coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **89(6)**, 1841–1849.
- Zhang, J., Zhou, X., Chen, L., Chen, Z., Chu, J., Li, Y. (2016). Comparison of the abundance and community structure of ammonia oxidizing prokaryotes in rice rhizosphere under three different irrigation cultivation modes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **32(5)**, 85.
- Zobiolo, L.H., Kremer, R.J., Oliveira Jr., R.S., Constantin, J. (2011). Glyphosate affects micro-organisms in rhizospheres of glyphosate-resistant soybeans. *Journal of Applied Microbiology* **110**, 118–127.